

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MORANA MALNAR
(BUDANOVIĆ)

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2015

Univerza v Ljubljani



Fakulteta za farmacijo

MORANA MALNAR

(BUDANOVIĆ)

**VREDNOTENJE UJEMANJA REZULTATOV
ELEKTROKEMILUMINISCENČNE METODE IN
ENCIMSKO IMUNSKO METODE Z MIKRODELICI PRI
DOLOČANJU GONADOTROPNIH HORMONOV IN
PROLAKTINA**

**EVALUATION OF THE AGREEMENT BETWEEN THE
RESULTS OF ELECTROCHEMILUMINESCENCE
IMMUNOASSAY AND MICROPARTICLE ENZYME
IMMUNOASSAY METHOD AIMED AT DETERMINING
GONADOTROPINS AND PROLACTIN**

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Magistrsko nalogo sem opravljala v laboratoriju Zdravstvenega doma dr. Franca Ambrožiča v Postojni pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm., in somentorstvom Valentine Bude, spec. med. biokem.

ZAHVALA

Zahvaljujem se izjemnemu mentorju in odličnemu izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju za strokovno vodenje, motivacijo in nasvete pri ustvarjanju magistrske naloge. Zahvala gre tudi somentorici, spec. med. biokem. Valentini Buda, saj mi je omogočila izvedbo praktičnega dela naloge in mi s svojimi strokovnimi nasveti pomagala pri izbiri teme naloge in ustrezne strokovne literature. Hvala tudi optimističnemu in skrbnemu kolektivu laboratorija Zdravstvenega doma dr. Franca Ambrožiča, posebej sodelavki Katarini Vukadinović za pomoč pri zbiranju testnih vzorcev in vso podporo in vzpodbudo. Iskrena hvala tudi prijateljici Aniti Brčaninović za pomoč in skrb pri izdelavi naloge. Posebej se zahvaljujem svojim najbližjim, ki so mi pomagali priti do cilja:

očetu Radomiru in materi Mariji, ki sta me naučila največjih vrednot in principov, ki me vodijo skozi življenje, ter mi s svojo požrtvovalnostjo omogočila brezskrben študij;

možu Danijelu, ki je moja podpora in najboljši življenjski sopotnik, hvala za nesebičnost, motivacijo, razumevanje in strpnost, ki jo je imel tekom mojega študija;

sestri Maji, ki me je s svojim optimizmom, vztrajnostjo in uspehi motivirala, da uresničim svoje cilje;

bratu Krešimiru, ker je med mojim študijem mislil name, ne misleč na sebe.

Velika zahvala gre tudi dedku Krešimiru, s katerim sem se med opazovanjem in vpijanjem sveta okrog sebe učila prvih črk in števil ter se navdušila za naravoslovne in medicinske vede;

tastu Ivanu in tašči Aniti, saj se veselita mojih uspehov in mi jih pomagata uresničiti.

Hvala vsem prijateljem in kolegom za nepozabna druženja in lepe spomine tekom študija.

Hvala profesorjem, ki so me usmerjali med šolanjem in mi pomagali najti in uresničiti svoje potenciale.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo z naslovom *Vrednotenje ujemanja rezultatov elektrokemiluminiscenčne metode in encimsko imunske metode z mikrodelci pri določanju gonadotropnih hormonov in prolaktina* samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm., in somentorstvom Valentine Bude, spec. med. biokem.

Podpis:

Nalogo je lektorirala Maša Rolih, uni. dipl. slovenistka.

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Darko Černe

Mentor: izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Somentorica: Valentina Buda, spec. med. biokem.

Član: doc. dr. Žiga Jakopin

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1 Spolni hormoni	1
1.1.1 Estrogeni	1
1.1.2 Gestageni	2
1.1.3 Androgeni	2
1.2 Gonadotropna hormona in prolaktin	3
1.2.1 Fsh	3
1.2.2 Lh	3
1.2.3 Prolaktin	4
1.3 Ženski spolni cikel	4
1.3.1 Ovarijski cikel	5
1.3.2 Endometrijski cikel	6
1.4 Motnje menstrualnega cikla	7
1.5 Diagnostika in zdravljenje	8
1.6 Metode določanja hormonov	11
1.6.1 MEIA (Microparticle Enzyme ImmunoAssay) metoda	13
1.6.2 ECLIA (ElectroChemiLuminescence ImmunoAssay) metoda	13
2. NAMEN DELA	16
3. METODE	17
3.1 Testni vzorci	17
3.2 Merilni instrumenti in reagenti	17
3.2.1 Imunološki analizator AxSYM	17
3.2.1.1 Princip merjenja Fsh, Lh in Prl	18
3.2.1.2 Reagenti in dodaten material	19
3.2.1.3 Kalibracijski material	20
3.2.1.4 Kontrolni material	21
3.2.1.5 Rezultati in merilna območja	22
3.2.1.6 Referenčne vrednosti	22

3.2.2.1	<i>Princip merjenja Fsh, Lh in Prl</i>	24
3.2.2.2	<i>Reagenti in dodaten material</i>	25
3.2.2.3	<i>Kalibracijski material</i>	27
3.2.2.4	<i>Kontrolni material</i>	28
3.2.2.5	<i>Rezultati in merilna območja</i>	29
3.2.2.6	<i>Referenčne vrednosti</i>	29
3.3	Verifikacija ECLIA metode	31
3.4	Statistične metode za vrednotenje ujemanja rezultatov dveh različnih analitskih metod	33
3.4.1	Popolno ujemanje rezultatov	34
3.4.2	Korelacija in linearna regresija	34
3.5	Metoda Blanda in Altmana: diagram razlik	35
3.6	Metoda Krouwerja in Montija: gorski diagram	37
4.1	Rezultati verifikacije ECLIA metode	39
4.2	Vrednotenje ujemanja rezultatov z Bland-Altman metodo	44
4.3	Vrednotenje ujemanja rezultatov s Krouwer-Montijevo metodo	48
5.	RAZPRAVA	52
6.	SKLEPI	63
7.	LITERATURA	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Hormonsko testiranje amenorej-----	10
Slika 2: Potek MEIA testa -----	15
Slika 3: ECLIA metoda – reakcija imunskega kompleksa z mikrodelcem -----	15
Slika 4: Imunološki analizator Axsym, Abbott Diagnostics -----	18
Slika 5: Imunološki analizator Cobas e 411, Roche Diagnostics GmbH -----	24
Slika 6: Fsh diagram razlik -----	45
Slika 7: Fsh diagram razlik (%)-----	45
Slika 8: Lh diagram razlik -----	46
Slika 9: Lh diagram razlik (%)-----	47
Slika 10: Prl diagram razlik-----	47
Slika 11: Prl diagram razlik (%) -----	48
Slika 12: Fsh gorski diagram -----	49
Slika 13: Lh gorski diagram -----	50
Slika 14: Prl gorski diagram -----	51

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Bolezni in motnje pri katerih se določajo vrednosti gonadotropinov in Prl 11	
Preglednica II: Dodatni material, reagenti in raztopine, ki so potrebne za določanje Fsh, Lh in Prl na analizatorju Axsym -----	20
Preglednica III: Referenčne vrednosti: Fsh , Axsym System, Abbott Diagnostics -----	23
Preglednica IV: Referenčne vrednosti vrednosti: Lh , Axsym System, Abbott, Diagnostics -----	23
Preglednica V: Referenčne vrednosti vrednosti: Lh , Axsym System, Abbott, Diagnostics -----	24
Preglednica VI: Dodaten material in raztopine, ki smo jih uporabili za določanje Fsh, Lh in Prl na Cobasu e 411-----	26
Preglednica VII: Referenčne vrednosti: Fsh , Cobas e 411, Roche Diagnostics GmbH ---	29
Preglednica VIII: Referenčne vrednosti :Lh , Cobas e 411, Roche Diagnostics GmbH ---	30
Preglednica IX: Referenčne vrednosti: Prl, Cobas e 411, Roche Diagnostics GmbH-----	30

Preglednica X: Rezultati natančnosti za Fsh in Lh, proizvajalca Roche Diagnostics GmbH	31
Preglednica XI: Rezultati natančnosti za Prl, proizvajalca Roche Diagnostics GmbH	32
Preglednica XII: Izračun kvantilov (centilov/percentilov) in prepognjenih percentilinih vrednosti	38
Preglednica XIII: Izračun mediane in 5./95. percentila	39
Preglednica XIV: Rezultati vrednotenja natančnosti metode ECLIA	41
Preglednica XV: Rezultati vrednotenja točnosti metode ECLIA	43

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Izračun relativne napake (29)	33
Enačba 2: Klasični model merjenja (32)	34
Enačba 3: Pearsonov korelacijski koeficient (32)	35
Enačba 4: Linearna regresija (32)	35
Enačba 5: Izračun 95-odstotnih meja ujemanja (IU) pri normalni porazdelitvi napak (32)	36
Enačba 6: Izračun 95-odstotnih meja zaupanja (IZ) pri normalni porazdelitvi napak (32)	36

SEZNAM OKRAJŠAV

A	androstendion
Ab	protitelo (ang. antibody)
Ag	antigen
Ab-Ag	kompleks protitelo-antigen
AMP	adenozin monofosfat
BMI	indeks telesne mase (ang. body mass index)
bpy	bipiridil (ang. bipyridyl)
β	sistematična napaka merjenja
C	ciljna vrednost
C-19	ciklopentanoperhidrofenantren
CK-MB	izoencim MB kreatin kinaze (ang. creatine kinase–myocardial band)
CLSI	Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (ang. Clinical and Laboratory Standards Institute)
CV	koeficient variacije (ang. coefficient of variation)
DHEA	dehidroepiandrosteron

DHEA-S	dehidroepiandrosteron-sulfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
E	absolutna napaka merjenja
ECL	elektrokemiluminiscenca (ang. electrochemiluminescence)
ECLIA	elektrokemiluminiscenčni imunski test (ang. electrochemiluminescence immunoassay)
ELISA	encimsko imunoabsorpcijski test (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
EMIT	homologi encimsko imunski test (ang. enzyme-multiplied immunoassay technique)
ER α	estrogenski receptor alfa
ER β	estrogenski receptor beta
ε	slučajna napaka merjenja
FIA	imunofluorescenčni test (ang. fluorescence immunoassay)
FPIA	polarizacijski imunofluorescenčni test (ang. fluorescence polarization immunoassay)
Fsh	folikle stimulirajoči hormon
FT3	prosti trijodtironin (ang. free triiodothyronine)
GnRH	gonadotropin sproščujoč hormon
H	visok (ang. high)
Hb	hemoglobin
hCG	humani horionski gonadotropin (ang. human chorionic gonadotropin)
^{125}I	radioizotop joda
IgA	imunoglobulin razreda A
IgG	imunoglobulin razreda G
IgM	imunoglobulin razreda M
IRMA	imunoradiometrijski test (ang. immunoradiometric assay)
IRP	International reference preparation
IS	mednarodni standardi (ang. International Standards)
IU	interval ujemanja/meji ujemanja
IZ	interval zaupanja/meji zaupanja
kD	kiloDalton
K ₃ EDTA	trikalijeva etilendiamintetraoctena kislina

KV	koeficient variacije
L	nizek (ang. low)
Lh	luteinizirajoči hormon
LIA	luminometrični imunski test(ang. luminometric immunoassay)
LIF	luteinizacija-zavirajoči faktor (ang. luteinization inhibiting factor)
M	srednji (ang. medium)
MEIA	encimsko imunski test z mikrodelci (ang. microparticle enzyme immunoassay)
MES buffer	2-(N-morfolino) etansulfonska kislina
MR	magnetna resonanca
MS	Microsoft
MU	metilumbeliferon
MUP	metilumbeliferil fosfat
NIBSC	Nacionalni inštitut za biološke standarde in kontrole (ang. National Institute for Biological Standards and Control)
O/x	izmerjena vrednost
17-OH progesteron	17-hidroksi progesteron
PC U1	PreciControl Universal 1
PC U2	PreciControl Universal 2
povp. vr.	povprečna vrednost
Prl	prolaktin
Pt-Ag	kompleks protitelo-antigen
Pth	paratiroidni hormon (ang. parathyroid hormone)
R	referenčna/sprejeta vrednost
RE	relativna napaka (ang. relative error)
RIA	radioimunski test (ang. radioimmuno assay)
RTG	rentgen
SD	standardna deviacija/standardni odklon (ang. standard deviation)
SHBG	spolne hormone vezoči globulin (ang. sex hormone binding globulin)
T3	trijodtironin (ang. triiodothyronine)
TEAH	tetraetil amonijev hidroksid
TPA	tripropilamin
Tsh	ščitnica spodbujajoči hormon (ang. thyroid stimulating hormone)

WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. The World Health Organization)
\bar{X}	aritmetična sredina/povprečje
ZD	Zdravstveni dom
ZDM	Zdravstveni dom Maribor

POVZETEK

V laboratoriju Zdravstvenega doma dr. Franca Ambrožiča v Postojni smo zamenjali zastareli imunološki analizator Axsym z novim analizatorjem Cobas e 411. Analizatorja se uporabljata tudi za merjenje serumske koncentracije hormonov, ki uravnavajo ženski spolni cikel: folikel stimulacijskega hormona (Fsh), luteinizirajočega hormona (Lh) in prolaktina (Prl). Te so pomembne v večstopenjski diagnostiki motenj ženskega spolnega cikla. Ker analizatorja uporabljata različni metodi merjenja analitov (Axsym- encimsko imunsko metodo z mikrodelci (MEIA), Cobas e 411- elektrokemiluminiscenčno metodo (ECLIA)), smo želeli ugotoviti, kako se ujemajo izmerjene vrednosti. Za analizo ujemanja meritev smo določili koncentracijo Fsh v 37 vzorcih, Lh v 42 in Prl v 45 serumskih vzorcih žensk. Za ustrezno vrednotenje ujemanja smo ocenili tudi natančnost in točnost metode ter sistematično in slučajno napako. Novo elektrokemiluminiscenčno metodo smo zato verificirali.

Natančnost (znotraj-serijska in meddnevna) metode je bila zadovoljiva pri vseh treh parametrih. Koeficienti variacije (KV) so bili znotraj priporočljivega kriterija 1–5 % in primerljivi s KV, ki jih je podal proizvajalec. Meritev Prl je bila najbolj natančna ($KV_{\text{med-dnevni}}$ 2,67 %) in meritev Fsh najmanj natančna ($KV_{\text{med-dnevni}}$ 4,19 %). Točnost metode je bila zadovoljiva pri vseh treh parametrih, saj so bila vsa povprečja rezultatov meritev znotraj referenčnih območij, ki jih je podal proizvajalec. Največjo relativno napako (RE) smo dobili pri Prl (16,58 %) za nizek nivo PreciControl Universal 1 (PC U1), najmanjšo RE (največja točnost) pa pri Lh (6,89 %) za visok nivo PreciControl Universal 2 (PC U2). Za vrednotenje ujemanja rezultatov smo uporabili dve praktični statistični metodi, in sicer metodi Blanda in Altmana ter Krouwerja in Montija, ki temeljita na enostavnih izračunih in preglednih grafičnih prikazih. Rezultate merjenja smo statistično analizirali v programu Microsoft Office Excel. Ujemanja rezultatov meritev smo prikazali v diagramu razlik in v gorskem diagramu. Obe metodi vrednotenja ujemanja rezultatov sta pokazali, da so pri vseh analitih prisotne sistematične in slučajne napake, razen pri Fsh, kjer napaka ni bila statistično značilna. Ugotovili smo tudi, da so razlike v rezultatih med metodama večje pri višjih koncentracijah analitov. Heteroskedastičnosti razlik med meritvami z različnima analizatorjema nismo opazili. Ugotovili smo, da je ujemanje ECLIA in MEIA metod neustrezno in da analizator Cobas e 411 pri vseh testiranih parametrih kaže višje rezultate kot analizator Axsym. Analizator Cobas e 411 ima tudi širša merilna območja in drugačne

referenčne vrednosti. Ker sta točnost in natančnost ECLIA metode zadovoljivi, je s praktičnega vidika ujemanje rezultatov obeh metod sprejemljivo.

Ključne besede: vrednotenje ujemanja, folikel stimulacijski hormon, luteinizirajoči hormon, prolaktin, encimsko imunska metoda z mikrodenci, elektrokemiluminiscenčna metoda, Bland-Altmanova metoda, Krouwer-Montijeva metoda

ABSTRACT

The laboratory of the Community Health Centre Dr. Franc Ambrožič Postojna has replaced its obsolete immunoassay analyzer AxSYM with the new analyzer Cobas e 411. These analyzers are used, among other things, also for the determination of female sexual hormones: follicle stimulating hormone (Fsh), luteinizing hormone (Lh) and prolactin (Prl) in human serum. The concentrations of these hormones, which are important for multi-level diagnostics of the female sexual cycle disorders, were measured in different numbers of samples (Fsh - 37; Lh – 42; Prl - 45).

The aim of the study was to determine whether these two methods can be used interchangeably taking into account that the two analyzers use different methods of analyte measurement (AxSYM: microparticle enzyme immunoassay method (MEIA), Cobas e 411: electrochemiluminescence immunoassay method (ECLIA)).

In order to evaluate the assessing agreement between the two methods appropriately we need to consider the precision (within-run and intermediate) and accuracy of the new method as well as the systematic and random errors. Therefore, a new ECLIA method was first verified by determining its precision and accuracy which were found to be adequate for all three parameters.

The coefficients of variation (CV) of precision were within the recommended criteria (1-5%) and comparable with the CV which had been determined by the manufacturer. The measurement of Prl was the most precise ($CV_{\text{intermediate}} 2,67\%$) whereas the measurement of Fsh has been the least precise ($CV_{\text{intermediate}} 4,19\%$). The accuracy of the method was adequate as well. The averages of results regarding the accuracy of the method were within the expected values which had been determined by the manufacturer. Prl was calculated to have the highest average relative error (a low level of PreciControl Universal 1 (PC U1) - 16,58%) while the lowest has been estimated for Lh (a high level of PreciControl Universal 2 (PC U2) 6,89%).

Consequently, the agreement between the two measurement methods was evaluated according to the two practical statistic methods, such as the Bland-Altman method and the Krouwer-Monti method which are both based on graphical techniques and simple calculations.

The results of measurement were statistically analysed in MS Excel. Their agreements were demonstrated with the Bland-Altman method (difference plot) and the Krouwer-Monti method (mountain plot).

Both methods obtained the presence of the systematic and random errors in all parameters (Fsh, Lh in Prl) whose concentrations had been measured by both analyzers. The systematic error was not statistically significant only in the case of Fsh. The differences in results of both methods increased linearly along with the concentration of analytes. However, there was no heteroscedasticity present.

Thus, it has been statistically verified that these two methods do not agree sufficiently and that the analyser Cobas e 411 displays higher results than the analyser AxSYM in the case of all parameters. Nevertheless, the analyzer Cobas e 411 has wider measuring ranges and different expected values.

In conclusion, the precision and the accuracy of the ECLIA method were adequate. For this reason, from the practical point of view, the agreement between the two methods is acceptable.

Key words: assessing agreement, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, microparticle enzyme immunoassay, electrochemiluminescence immunoassay, Bland-Altman method, Krouwer-Monti method

1. UVOD

1.1 Spolni hormoni

Spolni hormoni so steroidi topni v maščobah. Izločajo jih ženske in moške spolne žleze, skorja nadledvične žleze in posteljica. Njihovo izločanje uravnava hipotalamus in hipofiza, ki se nahajata v bazalnem delu možganov (1). Hipotalamus je 5 do 10 gramov težek majhen del diencefalona (1). Vsebuje številne znotrajcelične receptorje za hormone: estrogene (estrogenski receptor alfa ($ER\alpha$) in estrogenski receptor beta ($ER\beta$)), androgene, testosteron, progesteron (A in B receptorji), hormone nadledvičnice itd. (1). Hipotalamus izloča gonadotropin sproščujoč hormon (GnRH), ki spodbudi hipofizo, da začne izločati Fsh in Lh, ki uravnava izločanje spolnih hormonov (1). V krvi so spolni hormoni v dveh oblikah: prosti ali vezani na beljakovine. V glavnem so vezani na spolne hormone vežeči globulin (SHBG) in v manjši meri na albumin (2). V tarčno celico vstopijo samo nevezani (prosti) hormoni.

Spolne hormone lahko razdelimo v tri skupine (3):

- estrogeni,
- gestageni,
- androgeni.

1.1.1 Estrogeni

Estrogeni so skupina steroidnih kemičnih spojin in so sestavljeni iz 18 C-atomov. Glavni predstavniki so estradiol, estron in estriol (4). Naziv so dobili zaradi svojega pomembnega pomena v estrusu (menstrualnem ciklu) sesalcev (4). So ženski spolni hormoni s številnimi biološkimi učinki (5, 6):

- vplivajo na celično proliferacijo, razvoj tkiv in organov, ki so povezani z razmnoževanjem,
- omogočajo razvoj sekundarnih spolnih znakov,
- vplivajo na menstruacijo, ovulacijo in nosečnost,
- stimulirajo rast in razvoj dojk in tkiv za produkcijo mleka,
- kontrolirajo normalno delovanje urogenitalnega trakta in vazomotorike,
- povečujejo osteoplastno aktivnost (pospešeno rast v puberteti),

- vplivajo na porast ravni beljakovin v telesu (posledica intenzivne rasti spolnih organov, skeleta in drugih tkiv),
- pospešujejo metabolizem in nalaganje maščob v dojkah, predelu zadnjice, stegnih in podkožju,
- vplivajo na prekrvavitev.

Pri ženskah se izločajo iz ovarijskih foliklov, med nosečnostjo pa iz placente in v zelo majhni meri iz skorje nadledvičnice. Pri moških nastajajo majhne količine estrogenov v testisih (moških spolnih žlezah) (3). Estrogeni se uporabljajo tudi kot kontracepcijska sredstva in kot hormonski pripravki pri hormonskem zdravljenju (5). "Določanje njihovih koncentracij v nosečnosti ima velik pomen pri oceni delovanja placente in so zelo dober kazalnik funkcije jajčnikov" (4).

1.1.2 Gestageni

Najpomembnejši gestagen je progesteron. Je steroid sestavljen iz 21 C-atomov (4). V prvi polovici ovarijskega cikla ga izločajo ovariji in skorja nadledvičnice. V drugi polovici ga bolj intenzivno izloča rumeno telesce (corpus luteum) (3). Skupaj z estrogenom se sintetizirata iz holesterola ter v manjših količinah iz acetyl-koencima A (3). V krvi se veže na albumine in transkortin (1). Ta vezava je zelo šibka, zato hormon zelo hitro pride v tkiva. Metabolizira se v jetrih (3), izloča pa se v obliki 5β -pregnanediol konjugatov (3). Progesteron se uporablja v naslednje namene: za ohranjanje nosečnosti, pri grozečem splavu, pri motnjah menstrualnega cikla in kot kontraceptiv (3).

1.1.3 Androgeni

Androgeni so moški spolni hormoni. Med androgene prištevamo: dehidroepiandrosteron (DHEA), dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEA-S), androstendion (A) in testosteron (2). So derivati ciklopentanoperhidrofenantrena (spojine C-19), ki imajo številne biološke učinke (4, 2):

- spodbujajo spermatogenezo in spolno dozorevanje v puberteti,
- omogočajo razvoj moških sekundarnih spolnih znakov,
- pospešujejo linearno rast in zvečanje kostne gostote,
- spodbujajo izločanje eritropoetina in posledično produkcijo eritrocitov (1).

Androgene izločajo nadledvičnica in spolne žleze obeh spolov (4). Celice testisov izločajo največ testosterona, medtem ko celice ovarijev izločajo večje količine androstendiona (4). Androgeni se uporabljajo za zdravljenje primarnega ali sekundarnega hipogonadizma,

karcinoma dojke, anemije itd (3). Posebno klinično uporabo ima v postmenopavznem obdobju žensk, kjer v kombinaciji z estrogenom pozitivno deluje na počutje in spolni nagon ter zniža tveganje za razvoj osteoporoze (3).

1.2 Gonadotropna hormona in prolaktin

1.2.1 Fsh

Fsh ali folitropin je hormon, ki pripada družini gonadotropinov. V sinergističnem delovanju z Lh stimulira dozorevanje in delovanje ovarijev in testisov (7). Po kemični sestavi je glikoprotein sestavljen iz dveh podenot (α in β verigi (7)). Fsh, Lh, ščitnica spodbujajoči hormon (Tsh) in humani horionski gonadotropin (hCG) imajo enake α verige, medtem ko so β verige teh hormonov različne, saj so za vsak hormon specifične (7). Te verige določajo specifično biološko aktivnost hormonov (7). Molekulska masa Fsh znaša približno 32 kD (7). Izločanje, delovanje in vpliv Fsh na spolni cikel žene regulira hipotalamo-hipofizno-ovarijski sistem. Koncentracijo tega hormona v krvnem obtoku regulirajo steroidni hormoni z mehanizmom negativne povratne zanke (1). V jajčnikih Fsh in Lh stimulirata rast in dozorevanje folikla ter posledično biosintezo estrogenov znotraj foliklov (7). Najvišje koncentracije Fsh se kažejo sredi cikla, čeprav je to manj izrazito kot pri Lh (7). Razpolovni čas Fsh je 4 ure (1). Izloča se prek jeter in ledvic (1). Tekom življenja žensk se delovanje jajčnikov in izločanje estrogenov spreminja (1). Posledično se zato spreminjajo tudi koncentracije Fsh (npr. visoke koncentracije Fsh v menopavzi) (1). Pri moških ima Fsh vlogo spodbujevalca razvoja spermatogonija (7). Določanje koncentracij Fsh je pomembno pri ugotavljanju različnih motenj v delovanju hipotalamo-hipofizno-gonadnega sistema (7). Sočasno določanje koncentracij Fsh in Lh je uporabno pri naslednjih stanjih (7): iskanje vzrokov amenoreje (popolni izostanek menstruacije), sindrom policističnih jajčnikov, menopavzni sindrom, prirojene bolezni s kromosomskimi aberacijami, sum na pomanjkanje Leydigovih celic in azospermija pri moških (odsotnost spermatozoidov v ejakulatu).

1.2.2 Lh

Lh spada v skupino gonadotropinov (8). Stimulira in regulira rast in dozorevanje gonad (8). Ima molekulska maso 29,5 kD (8). Sestavljen je iz 121 aminokislin in treh sladkornih verig (8). Lh se v krvni obtok sprošča pulzirajoče iz gonadotropnih celic adenohipofize (8). Iz krvnega obtoka preide v ovarije. V ovarijih stimulira rast in dozorevanje folikla ter sintezo estrogenov in progesterona (8). Lh doseže največjo koncentracijo sredi spolnega

cikla (8). Takrat spodbudi ovulacijo in nastanek rumenega telesca (corpus luteum), ki izloča progesteron (8). Lh v Leydigovih celic testisov spodbuja nastajanje testosterona (8). Razpolovni čas Lh je 30 minut (1). Izločata ga ledvici in jetra (1). V diagnostiki motenj spolnega cikla je pomembno sočasno določanje koncentracij Fsh in Lh (7) .

1.2.3 Prolaktin

Prl je hormon, ki ga izloča adenohipofiza (9). Izločanje uravnava hipotalamus, ampak na drugačen način kot pri ostalih hormonih adenohipofize (10). Hipotalamus namreč zavira njegovo izločanje (10). Zato je pri različnih poškodbah hipotalamusa in hipofize sekrecija prolaktina povečana, sekrecija ostalih hormonov pa zmanjšana (10). Izločanje Prl uravnava tudi dopamin, ki deluje inhibitorno. (10) Dopamin pripada skupini kateholaminov in lahko poveča sekrecijo Prl za 10-krat (10). Molekulska masa Prl znaša približno 22–23 kD (9). Sestavljen je iz 198 aminokislin in je v serumu prisoten v treh različnih oblikah (9): monomerni obliki (80 %), ki je biološko in imunološko aktivna oblika, dimerni obliki (5–20 %), ki je biološko neaktivna oblika in tetramerni obliki (0,5–5%), ki ima zelo majhno biološko aktivnost. Prl uravnava razvoj in diferenciacijo mlečne žleze (9). Visoke koncentracije tega hormona (hiperprolaktinemije) zavirajo steroidogenezo v jajčnikih, produkcijo in sekrecijo hipofiznih gonadotropinov (9). Med nosečnostjo se pod vplivom estrogenov in progesterona koncentracije Prl zvišajo (10). Po porodu spodbujevalno deluje na laktacijo (9). Eden od vzrokov motenj plodnosti pri moških in ženskah je hiperprolaktinemija (9). Vrednosti Prl se določajo in so pomembne v diagnostiki naslednjih stanj (9): izostanek ovulacije (anovulacijski cikli), hiperprolaktinemična amenoreja in galaktoreja (izločanje mlečne tekočine iz dojk izven obdobja laktacije), ginekomastija (povečanje žleznega tkiva dojk pri moških), azospermija (odsotnost spermijev v ejakulatu) in pri sumu na karcinom dojke in karcinom hipofize.

1.3 Ženski spolni cikel

Za ženski spolni cikel so značilne mesečne, ritmične spremembe v izločanju hormonov, spremembe v jajčnikih in spolnih organih (11). Ovarijske spremembe povzročata predvsem hormona Fsh in Lh (11). Tekom otroštva se ne izločata, zato sta jajčnika neaktivna. Začneta se izločati med 9. in 10. letom starosti (11). Hipofiza ju izloča v velikih količinah med 11. in 16. letom starosti, s tem pa se začne razvoj normalnega mesečnega spolnega cikla (11). Med posameznicami se ciklusi razlikujejo po pogostosti, trajanju in jakosti (11). Cikel traja v povprečju 28 dni (11). Vsak mesec se iz jajčnikov sprosti samo eno jajčece, iz

katerega se lahko razvije samo en fetus (11). Dogodki tekom cikla pripravijo maternično sluznico endometrija za implantacijo oplojenega jajčeca (11). Za normalen potek cikla je potrebno usklajeno delovanje hipotalamusa, hipofize, jajčnikov ter endometrija (11). Glede na mesto dogajanja lahko cikel razdelimo na ovarijski in endometrijski (11).

1.3.1 Ovarijski cikel

V jajčnikih potekata dve fazi cikla: folikularna in luteinska faza (11). Značilnost *folikularne faze* je rast foliklov (11). V jajčnikih novorojenčkov je različno število jajčnih celic, ki so obdane z enim slojem granuloznih celic (11). Ta skupek imenujemo *primordialni folikel* (11). Granulozne celice prehranjujejo jajčece in izločajo oocitni faktor, ki inhibira delitev tako, da jajčna celica ostane na primordialni stopnji do profaze mejoze (11). Posledica prve stopnje rasti foliklov je povečanje jajčne celice in rast granuloznih celic (9). Takrat folikel postane prepoznaven kot *primarni folikel* (11). Na začetku ovarijskega cikla se izločajo večje količine Fsh kot Lh (11). Hormona, še posebej Fsh, povzročata vsak mesec pospešeno rast 6 do 12 primarnih foliklov (11). Samo en folikel dozori in doseže največjo velikost (11). Temu sledi proliferacija granuloznih celic, ki se zbirajo v več plasti (11). Oblikuje se teka folikuli (vezivna ovojnica (11)). Celice teke oblikujejo zunanjo plast (teka eksterna) in notranjo plast (teka interna (11)). Folikel z vezivno ovojnico imenujemo *sekundarni folikel* (11). Celice teke interne imajo značilnosti epiteloidnih celic in izločajo steroidne hormone (estrogene in progesteron (11)). Celice zunanje plasti so vaskularizirane vezivne celice, ki oblikujejo kapsularni obroč (11). Proliferaciji sledi razvoj antruma – votline, ki je zapolnjena s foliklovo tekočino in z veliko količino estrogenov (11). Tako nastane *terciarni* ali *Grafov folikel* (antralni folikel (11)). Zvišano izločanje Fsh lahko povzroči še večjo rast in nastanek *vezikularnega folikla* (11). Stopenjski rast foliklov omogočajo hormoni: estrogen, ki povečuje število Fsh receptorjev in občutljivost granuloznih celic, Fsh in estrogen, ki stimulirata izločanje Lh, estrogen in Lh, ki spodbudita nadaljnjo proliferacijo in sekrecijo celic teke (11). Po enem tednu (ali več) rasti preden začne ovulacija, začne en folikel preraščati druge (11). V procesu, ki se imenuje atrezija, ostali folikli propadejo (11). Predpostavljajo, da je dominanten tisti folikel, ki ima več Fsh receptorjev (11). Poleg tega estrogeni zavirajo hipotalamus in posledično tudi rast foliklov (11). Atrezija je izredno pomemben dogodek, ker omogoča rast samo enega folikla, ki bo šel v proces ovulacije (11). Ovulacija se pri ženski, ki ima normalen 28-dnevni spolni cikel, pojavi 14. dan po nastopu menstruacije (11). Neposredno

pred ovulacijo se zunanja stena folikla razgradi (11). Temu sledi iztekanje tekočine iz folikla v osrednji del kapsule (11). Ta del počne, tekočina se zlije in izplavlja jajčno celico, obdano z nekaj tisoč granuloznih celic (11). Ovulacija je sprožena zaradi delovanja Lh in Fsh (11). Njihove koncentracije se 2 dni pred ovulacijo 2 do 3-krat povečajo (11). Lh spodbudi izločanje progesterona in nastanek progesteron izločajočih celic (11). Razpad centralnega dela kapsule povzroča proteolitični encim iz lizosomov, ki ga sprošča zunanja plast (11). Razpad foliklov je posledica razraščanja krvnih žil v steni folikla in sproščanja prostaglandinov (11). Luteinska faza se začne nekaj ur po sprostitvi jajčne celice iz folikla (11). V procesu luteinizacije nastajajo skupine celic, ki jih imenujemo rumeno telo (corpus luteum (11)). Rumeno telo sintetizira steroidne hormone (11). Estrogen in progesteron v luteinski fazi zmanjšujeta izločanje Fsh in Lh (11). Izločanje Fsh dodatno zavira hormon inhibin, ki ga izločajo luteinske celice (11). Zaradi nizkih koncentracij gonadotropnih hormonov, luteinske celice involvirajo (11). To pomeni, da rumeno telo izgubi izločevalno funkcijo in pridobi belo barvo. Tako nastane belo telo (corpus albicans (11)). Proces se zgodi 26. dan ovulatornega cikla in 2 dni pred menstruacijo (11). Luteinizacijo uravnava predvsem Lh in luteinizacija-zavirajoči faktor (LIF (11)). Po končanem procesu se poveča koncentracija Fsh in Lh v krvi in začne se nov ovulacijski cikel (11).

1.3.2 Endometrijski cikel

Cikel v endometriju poteka v treh fazah: proliferacijska faza, sekrecijska faza in menstruacijska faza (11). V fazi proliferacije velike količine izločenega estrogena spodbujajo proliferacijo epitelijskih celic (11). Med ovulacijo se številne celice strome povečajo in razvijejo se endometrijske žleze, ki izločajo sluz in na ta način usmerjajo spermije v maternico (11). Progesteron v sekrecijski fazi spodbuja proliferacijo endometrija in razvoj žlez (11). Endometrij se odebeli na 5–6 mm in vsebuje prehranjevalne snovi za oplojeno jajčece (11). Dva dni pred koncem cikla se zmanjšajo koncentracije estrogena in progesterona in nastopi menstruacijska faza (11). V tej fazi endometrij involvira in krčijo se krvne žile. Tekom 24–36 ur začne iztekati kri iz krvnih žil (11). Nekrotični deli se odtrgajo od maternice in vrhnji sloj maternice se odlušči. Tekom normalne menstruacijske faze se izgubi okoli 40 mL krvi in 35 mL serozne tekočine (11).

1.4 Motnje menstrualnega cikla

Sodobno življenje, okoljske spremembe in novi stresorji povzročajo neravnovesje neuroendokrinega sistema in s tem posledično vse pogostejše motnje menstrualnega cikla.

Motnje lahko razdelimo na (6): juvenilno metroragijo, menstrualne motnje v generativnem obdobju in predklimakterično metroragijo.

Juvenilna metroragija je menstrualna motnja, ki se pojavlja med 12. in 14. letom starosti, po prvi menstruaciji – menarhi (6). V tem obdobju centralni živčni sistem še ni povsem dozorel in to vpliva na hipofizno izločanje hormonov, ki uravnavajo menstrualni cikel (6). Nepravilno razmerje Fsh in Lh povzroča menstrualne motnje, ki se kažejo kot dolgotrajne in obilne menstrualne krvavitve, ki jih imenujemo juvenilne metroragije (6). S tem je povezan tudi anovulacijski cikel. Zaradi izostanka ovulacije in pomanjkanja progesterona endometrij raste, ampak se ne transformira (6). Stimulacija jajčnikov ni več zadostna in nastopi tako imenovana "prekinitvena krvavitev" (6). **Menstrualne motnje v generativnem obdobju** (obdobje med menarho in klimakterijem) lahko razdelimo modificirano po Pschyremblu (Pschyrembel, 1969) na *motnje v pogostnosti menstrualnih krvavitev* in *motnje v jakosti menstrualnih krvavitev* (6). *Motnje v pogostnosti menstrualnega cikla* so lahko: oligomenoreje, amenoreje, vmesne krvavitve in polimenoreje (6). **Oligomenoreja** je blažja motnja in je posledica zmanjšane hormonske dejavnosti jajčnikov (6). Menstrualni cikli so redni, ampak v daljših časovnih presledkih (več kot 35 dni (6)). Vzrok za to je lahko daljša proliferacijska faza cikla, ki ne zahteva zdravljenja, ali pa odsotnost ovulacije, ki je povezana z neplodnostjo (6). **Amenoreja** je lahko fiziološka ali patološka motnja, ki se kaže kot izostanek menstruacije več kot 4 mesece (6). Fiziološki izostanek menstruacije nastopi v obdobjih pred menarho, v času nosečnosti in dojenja ter po menopavzi (6). Patološka amenoreja pomeni izostanek menstruacije brez fiziološkega vzroka (6). Etiologija je raznovrstna in motnja zahteva stopenjsko diferencialno diagnostiko (12). Najpogostejši vzrok primarne amenoreje je organska motnja v razvoju jajčnikov, maternice in nožnice (6). Ostali vzroki so različna vnetja in zmanjšana hormonska dejavnost jajčnikov (6). Sekundarno amenorejo, ki je posledica neravnovesja neuroendokrinega sistema, pogosto sprožijo zunanji stresorji (6). Vzroki centralnih amenorej, ki se klasificirajo kot hipogonadotropne, so: sindrom policističnih jajčnikov, periferne endokrinopatije (motnje ščitnice, nadledvične žleze, hormonski tumorji), motnje hipotalamusa in hipofize (tumorji, vnetja, disfunkcije, hiperprolaktinemija – povišane vrednosti prolaktina, zapoznela puberteta, psiho-nevro-endokrinološke motnje (12,13)).

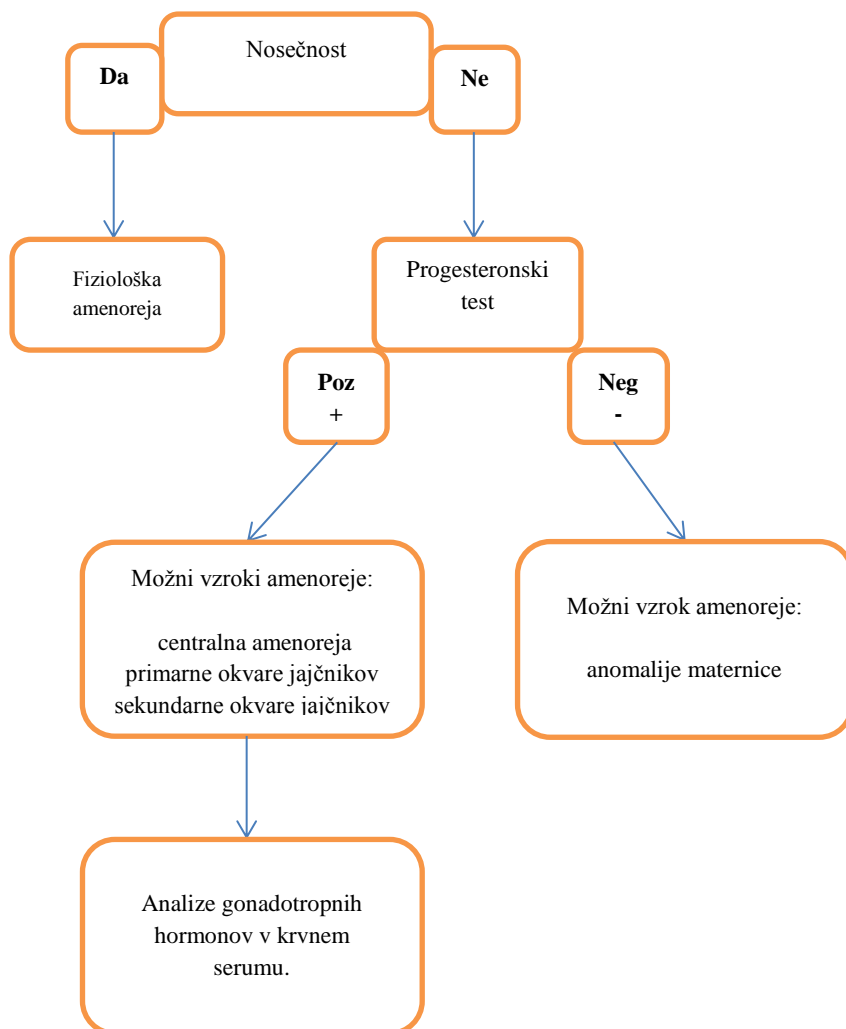
Ovarijske amenoreje so izrazito hipergonadotropne in hipoestrogene (13). Tipičen primer primarne ovarijske amenoreje je disgeneza gonad – Turnerjev sindrom (13). Sekundarna ovarijska amenoreja je fiziološka v menopavzi, patološka pa v predčasni menopavzi in pri kroničnih anovulacijah (sindrom policističnih jajčnikov (13)). Periferne amenoreje so eugonadotropne (normogonadotropne). To pomeni, da je os hipotalamus - hipofiza - jajčniki urejena (13). Motnje se javijo zaradi anatomskih defektov maternice in/ali vagine (13). Najpogostejši vzrok te amenoreje je Sy. Mayer-Küster-Rokitansky sindrom (agnezija maternice in vagine (13)). **Vmesne krvavitve** so motnje, ki se lahko pojavijo pred menstruacijo, na sredini med dvema menstruacijama ali po končani menstruaciji (6). Tiste, ki se pojavijo nekaj dni pred menstruacijo, so hormonskega vzroka in so posledica nezadostnega hormonskega spodbujanja rumenega telesca (6). Vmesne krvavitve so običajno znak ovulacije in so hormonskega porekla (6). Krvavitve, ki se pojavljajo po končani menstruaciji, so znak organskih sprememb, kot so: miomi, endometrioza, polipi (12). **Polimenoreja** pomeni prepogosto menstrualno krvavitev, ki se pojavlja na 21–24 dni (6). Polimenoreja, ki je povzročena s skrajšanjem sekrecijske faze menstrualnega cikla, pogosto povzroča neplodnost (6). Tista, ki je povzročena s skrajšanjem folikularne faze cikla, se ne zdravi in ne pomeni hujše motnje (12). *Motnje v jakosti menstrualnih krvavitev* so razdeljene na hipomenoreje in hipermenoreje (13). **Hipomenoreje** so šibke menstrualne krvavitve, ki trajajo 1–2 dni in so v glavnem dedne (13). Niso posledica resnih motenj (13). V določenih primerih se pojavljajo kot posledica patoloških sprememb endometrija, ki so nastale po porodih, splavih in vnetjih (13). **Hipermenoreje** pomenijo obilne in močne menstrualne krvavitve, ki prenehajo v normalnem, pričakovanem času (13). Menoragije so zelo močne in dolge menstrualne krvavitve (13). Obe motnji imata organske vzroke, kot so: vnetja, miomi, polipi, karcinomi itn (13). **Predklimakterična (predmenopavzalna) metroragija** je stanje močne anovulacijske krvavitve v obdobju pred menopavzo (13). Vzrok za to je na nivoju jajčnikov, hipofizna stimulacija je normalna (13). Maloštevilni folikli v jajčnikih rastejo in izločajo estrogene, endometrij se razvija, ampak do ovulacije ne pride zaradi bioloških sprememb v jajčnikih (13). Posledica so močne in obilne krvavitve (13).

1.5 Diagnostika in zdravljenje

Diagnostika in diferencialna diagnostika motenj spolnega cikla temeljita na anamnezi, fizikalnih pregledih, ultrazvočni diagnostiki, radioloških preiskavah in hormonskih testih

(12). Primer takšnega pristopa je diagnostika najpogostejših motenj, amenorej (12). Z *anamnezo* pridobivamo podatke o: prisotnih simptomih (ki so lahko rezultat pomanjkanja estrogenov), poteku in fazi pubertete, razvoju sekundarnih spolnih znakov, poteku motnje in podatke o tem, ali gre za primarno ali sekundarno amenorejo (12). Predvsem je treba izključiti nosečnost (12). S *fizičnim pregledom*, ki vključuje splošni in ginekološki pregled, pridobimo podatke o telesni teži in višini, indeksu telesne mase (BMI), razvoju sekundarnih spolnih znakov, morebitnih anomalijah spolnih organov, znakih hiperandrogenizma (akne, poraščenost), pojavu izcedka iz dojk (12). V diagnostiki so koristni tudi aparati za ultrazvočno diagnostiko, ki prikazujejo anomalije in delovanje spolnih organov (12). Kot dopolnilne metode se uporabljajo rentgen (RTG) in magnetna resonanca (MR) (12)). Če predhodno omenjeni diagnostični pristopi ne razkrijejo diagnoze, je potrebno izključiti hiperprolaktinemijo, kot možni vzrok amenoreje (14). Nato se lahko izvedeta dva enostavna *hormonska testa*: progesteronski (gestagenski) test in estrogeno progesteronski test (14). Pri *progesteronskem testu (gestagenskem testu)* se ocenjuje reakcijo na 10–12-dnevni vnos progestina (sintetičnega nadomestila za progesteron (14)). Če se v obdobju nekaj dni po prekinitvi vnosa pripravka pojavijo maternične krvavitve, pomeni, da je izvedeni test pozitiven (14). Če je krvavitev izostala, je test negativen (14). Pozitiven test pomeni, da je sinteza estrogenov v ovarijih adekvatna, ampak je nivo progesterona nizek (14). V primeru perzistirajočih amenorej se nadomestno gestagensko zdravljenje nadaljuje naslednje 3 mesece (14). V primeru negativnega testa se izvaja *estrogen-progesteronski test (estrogen-gestagenski test, estrogen-progestinski test)* na način, da se v organizmu v obdobju treh tednov peroralno vnašajo kombinirani hormonski pripravki (naravni estrogen kombiniran s progestinom ali dvofazni peroralni kontraceptivi), ki so potrebni za transformacijo endometrija (14). Če po prekinitvi vnosa pripravkov pride do krvavitve, je test je pozitiven, to pa pomeni, da sta maternica in endometrij urejena in da je spolni sistem pretočen (12,14). Če krvavitve izostanejo, je test negativen (14). Vzroki za to so različni: lahko so prisotne anomalije maternice, okvarjena je funkcija endometrija ali pa so prisotne ovire v odtoku krvi zaradi anatomskih anomalij (14). Pozitiven estrogen-progesteronski test in negativen progesteronski test pomenita resne motnje (14). V teh primerih je potrebno ločiti, ali so prisotne primarne ali sekundarne motnje jajčnikov in ali je prisotna centralna amenoreja (14).

Diagnostika se nadaljuje z analizami gonadotropnih hormonov v krvnem serumu (12). Negativen estrogen-progesteronski test in negativen progesteronski test diagnostiko usmerjata proti amenorejam zaradi anomalij uterusa (14). Hormonsko testiranje amenorej prikazuje slika 1 (12, 14).



Slika 1: Hormonsko testiranje amenorej

(prirejeno po viru: Wuttke W, Hinney B. Ovarian function. In: Lothar T. Clinical Laboratory Diagnostics. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. 1st ed. Frankfurt, Main, Germany: TH-Books, 1998: 1091–1094.)

Poleg omenjenih hormonov se določajo tudi: estrogen, estradiol, Tsh, Anti-Müllerjev hormon, androstendion, testosteron in progesteron (12). V preglednici I so prikazana različna bolezenska stanja in motnje, pri katerih se določajo vrednosti Fsh, Lh in Prl (15).

Preglednica I: Bolezni in motnje pri katerih se določajo vrednosti gonadotropinov in Prl

Hormon	Nizke koncentracije v krvnem serumu	Visoke koncentracije v krvnem serumu
Hipofizna gonadotropina: Fsh in Lh	Sekundarni hipogonadizem <ul style="list-style-type: none"> • Kallmannov sindrom (dedno avtosomno izolirano pomanjkanje GnRH) • Zmanjšano hipofizno izločanje Fsh in Lh • Pomanjkanje gonadotropinov. 	Primarni hipogonadizem <ul style="list-style-type: none"> • Anorhija (prirojeno pomanjkanje obeh testisov) • Okvara testisov • Menopavza Tumorji hipofize Prezgodnja puberteta Sindrom neobčutljivosti na androgene Luteinska faza menstrualnega cikla
Prl	Hipopituitarizem <ul style="list-style-type: none"> • Poporodna hipofizna nekroza • Idiopatski hipogonadotropni hipogonadizem Zdravila <ul style="list-style-type: none"> • Dopaminski agonisti • Ergot derivati • Lévodopa, apomorfin, klonidin. 	Ostale endokrine bolezni <ul style="list-style-type: none"> • Hipotiroidizem • Addisonova bolezen • Sindrom policističnih jajčnikov • Presežek glukokortikoidov – normalne ali zmerno povišane vrednosti prolaktina Ektopična nastajanje prolaktina Prezgodnja puberteta Nevrogene motnje Stres, nosečnost, dojenje Kronična okvara ledvic Okvara jeter Idiopatski vzroki Amenoreja Galaktoreja Hipofizne lezije Hipotalamične lezije

Na drugi stopnji se določajo koncentracije hormonov nadledvične žleze in 17-hidroksi progesterona (17-OH progesterona) (12). Nekatere motnje (npr. centralna amenoreja) zahtevajo dinamične analize hormonov, t. j. izvajanje primerjalnih testov, ki ocenjujejo funkcijo hipofize in perifernih žlez (12). Motnje spolnega cikla so številne in raznovrstne kot tudi njihovi vzroki. Včasih zdravljenje ni potrebno, včasih pa je dovolj zdraviti samo znake. Določena stanja zahtevajo zdravljenje s hormonskimi pripravki (12).

1.6 Metode določanja hormonov

"Zaradi zelo majhnih koncentracij hormonov v serumu, plazmi, seču in slini, ki se gibljejo od mikromolarnih do pikomolarnih, potrebujemo zelo občutljive laboratorijske tehnike" (2). Za določanje hormonov se uporabljajo imunokemjski testi (2). "Imunokemija je

področje laboratorijskega dela, ki uporablja protitelesa (Ab) ali druge molekule imunskega odziva kot kemijski reagent" (16). Princip imunokemijskih metod je merjenje neke snovi na osnovi reakcije med antigeni (Ag) in Ab (2). V teh reakcijah je ena od komponent vedno označena (2). "Označevalec je lahko radioizotop, encim, dolgoživi radikal, fluorescenčna ali luminiscenčna snov ali bakteriofag" (2). "Vrsta označevalca pogojuje tehniko merjenja, ki je z druge strani pogojena z različnimi možnostmi detekcije (2)". Poznamo **kompetitivne in nekompetitivne teste** (17). V kompetitivnih imunoloških testih je količina označenega Ag omejena, količina neoznačenega pa je neznana (17). Pride do tekmovanja med označenim in neoznačenim Ag za omejeno število vezavnih mest Ab (17). Čim več je Ag v vzorcu, tem manj označenega Ag se veže na Ab (17). Pri nekompetitivnih testih imamo neomejeno število označenih primarnih Ab in je količina Ag sorazmerna s količino Ab (17). Razlikujemo tudi **homogene** in **heterogene** imunološke teste (17). Homogeni ne zahtevajo ločevanja nevezanih kompleksov od vezanih kompleksov, saj sta encim kot substrat del reakcije (17). So lažji in hitrejši za izvedbo kot heterogeni testi, ki zahtevajo ločevanje vezanih kompleksov Ag-Ab od nevezanih kompleksov (17)".

V kliničnih laboratorijih se uporabljajo različni imunokemični testi. Glede na označevalce razvrščamo metode na (2, 16):

- izotopske, kjer je označevalec radioaktivni tritij ali radioizotop joda (^{125}I) (radioimunski test (RIA), imunoradiometrijski test (IRMA)) in
- neizotopske, kjer je označevalec encim (encimsko imunoabsorpcijski test (ELISA), homologni encimsko imunski test (EMIT), MEIA), fluorofor (imunofluorescenčni test (FIA); polarizacijski imunofluorescenčni test (FPIA)) in luminiscenčna snov (luminometrični imunski test (LIA), ECLIA).

Izotopske metode so primerne za ligande z nizko kot tudi z visoko molekulsko maso (2, 16). So visoko specifične, dobro občutljive in so uporabne samo v heterogenih sistemih (2, 16). Pomanjkljivost teh metod je relativno kratka življenska doba izotopov ter škodljiv vpliv na izvajalca analize (2). Neizotopske metode so večinoma homogene in se uporabljajo za analize snovi z nizko molekulsko maso (16). Poleg prej omenjenih neizotopskih metod sem uvrščamo tudi nefelometrijske, turbidimetrijske in lateks aglutinacijske metode, vključno s koloidno agregacijo (16). Prednost homogenih neizotopskih metod pred izotopskimi je: enostavnejša izvedba, dostopnost za avtomatizacijo in neškodljivost za laboratorijsko osebje (2, 16). Za določanje serumskih

koncentracij Fsh, Lh in Prl smo uporabili dva imunokemijska, neizotopska testa: MEIA in ECLIA.

1.6.1 MEIA (Microparticle Enzyme ImmunoAssay) metoda

MEIA metoda je encimsko imunska metoda, ki uporablja raztopino lateks mikrodolcev za merjenje analitov (17). Mikrodolci so majhne kroglice, obložene z Ab, kar je specifično za analit, ki ga merimo (17). Učinkovita površina mikrodolcev povečuje kinetiko testa in zmanjšuje čas inkubacije (17). Zato je izvedba MEIA testa hitrejša kot izvedba ostalih imunokemijskih testov (17). Ta metoda se je začela uporabljati zaradi avtomatizacije meritev velikih molekul, kot so označevalci (17): srčne funkcije, plodnosti, rakavih bolezni, presnove, ščitnične funkcije, hepatitisa itd. Metoda zahteva naslednje komponente, ki so raztopljene v specifičnem pufru (17):

- mikrodolci obloženi z molekulo (Ag, Ab ali virusni delec),
- označen konjugat – najpogosteje se uporablja encim alkalna fosfataza in
- encimski substrat – fluorescenčni 4-metilumbeliferil fosfat (4-MUP).

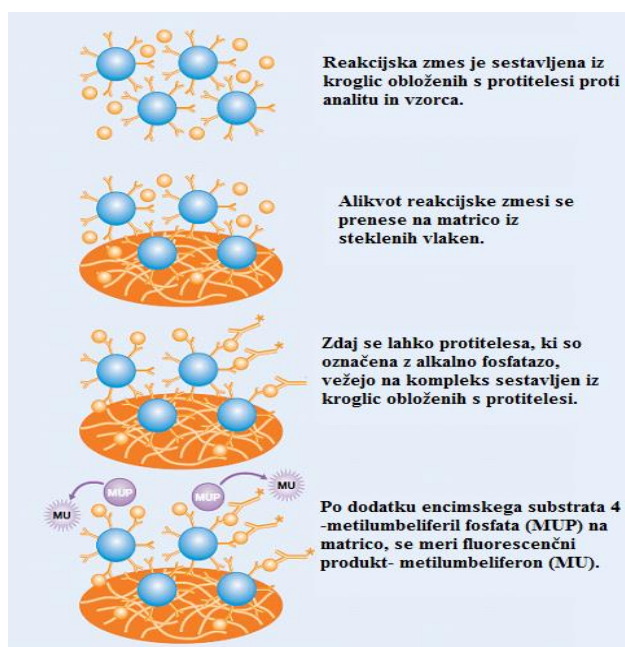
Postopek (17): 1. Mikrodolci obloženi z molekulo (npr. z Ab proti analitu, ki ga merimo) in vzorec (v katerem je analit) se inkubirajo in oblikujejo reakcijsko zmes. 2. Alikvot reakcijske zmesi se prenese na matriks iz steklenih vlaken. Matriks služi za pritrditev kompleksov. 3. Ab, konjugirana z alkalno fosfatazo, se vežejo na kompleks mikrodolcev. 4. Matriksu se doda 4-MUP encimski substrat. 5. Konjugat katalizira hidrolizo 4-MUPa do metilumbeliferona (MU). 6. Meri se količina dobljenega fluorescenčnega produkta MU, ki je sorazmerna koncentraciji analita v testnem vzorcu (nekompetitivna oblika testa (17)). Postopek prikazuje slika 2.

1.6.2 ECLIA (ElectroChemiLuminescence ImmunoAssay) metoda

ECLIA metoda temelji na elektrokemiluminiscenčnih reakcijah (ECL). ECL reakcije se pojavljajo s številnimi molekulami, vključno s spojinami rutenija, osmija, renija in drugih elementov (18). V teh reakcijah visoko reaktivne spojine nastajajo iz stabilnih predhodnikov na površini elektrod, medsebojno reagirajo in tako proizvajajo svetlobo (18). Razvoj ECLIA temelji na uporabi rutenij (II)-tris (bipiridil (bpy)) kompleksa in tripropilamina (TPA (18)). Končni kemiluminiscenčni produkt nastane v detekcijskem koraku. Kemiluminiscenčne reakcije, ki vodijo do emisije svetlobe iz rutenijevega kompleksa, se prej sprožijo električno kot kemično (18). To se doseže z uporabo napetosti imunskih kompleksov, ki so pritrjeni na kroglice, obložene s streptavidinom (18). Prednost

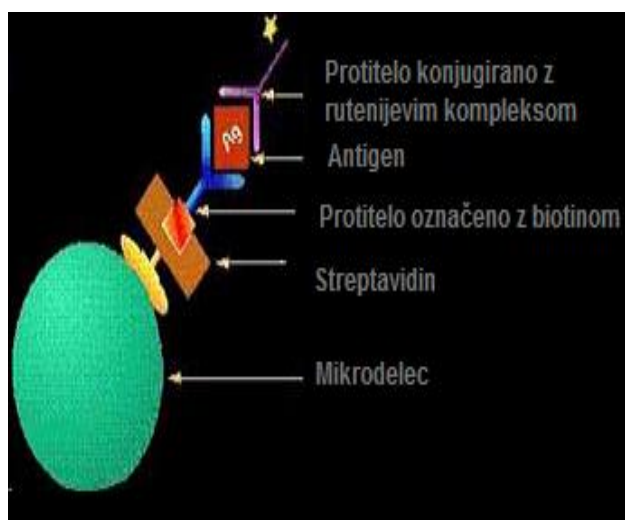
električno spodbujene kemiluminiscenčne reakcije je, da se celotna reakcija lahko natančno nadzoruje (18). Dostopne so 3 oblike testa: kompetitivna oblika-za nizkomolekulske analite (npr. prosti trijodtironin (FT3)), "sendvič" oblika (eno/dvostopenjska) – za analite večje molekulske mase (Fsh, Lh, Prl) in "premostitvena" oblika – za določanje Ab v vzorcu (imunoglobulinov razreda G (IgG), imunoglobulinov razreda M (IgM), imunoglobulinov razreda A (IgA) (18)). Princip in postopek **kompetitivne metode** (18): V prvem koraku se vzorec in specifično Ab (npr. specifično anti-trijodtironin (anti-T3) Ab), ki je označeno z Ru²⁺ kompleksom prenesejo v testno posodico. Po prvi inkubaciji se doda T3 označen z biotinom in paramagnetne kroglice obložene s streptavidinom. Prosto vezavno mesto označenega Ab zasede kompleks "Ab-hapten". Celotni kompleks s kroglicami povezuje interakcija biotina in streptavidina. Po drugi inkubaciji se imunski kompleksi premestijo v merilno celico in se "magnetno ulovijo" na delovne elektrode. Nevezani reagent in vzorec se spereta. V elektrokemiluminiscenčni (ECL) reakciji je konjugat derivat rutenija in kemiluminiscenčna reakcija je električno stimulirana. Meri se količina oddane svetlobe, ki je obratno sorazmerna količini Ag v testnem vzorcu. Koncentracija Ag se ovrednoti in izračuna s pomočjo kalibracijske krivulje, ki je bila določena z uporabo standardov znanih koncentracij Ag (18). Princip in postopek **"sendvič metode"** (18): 1. inkubacija: testni vzorec, monoklonalna specifična Ab (npr. monoklonalno Fsh-specifično Ab), obložena z biotinom, in monoklonalna specifična Ab (npr. monoklonalno Fsh-specifično Ab), označeno z rutenijevim kompleksom, formirata "sendvič imunski kompleks"; 2. inkubacija: po dodatku mikrodelcev, obloženih s streptavidinom, se kompleks veže na trdo fazo. Vezavo omogoča interakcija biotina in streptavidina (slika 3). Reakcijska zmes se prenese v merilno celico. Mikrodelci se "magnetno ulovijo" na površje elektrod. Nevezane snovi se sperejo. Z dovajanjem napetosti elektrodam se inducira ECL reakcija in emisija svetlobe, ki se meri s fotopomnoževalcem. Količina oddane svetlobe je sorazmerna količini Ag (npr. Fsh) v vzorcu. Koncentracija Ag se izračuna s pomočjo kalibracijske krivulje (18). Princip **"premostitvene metode"** (18) je podoben "sendvič princip" z razliko, da se test uporablja za detekcijo Ab v vzorcu, ne pa Ag. V tem primeru reagenti vsebujejo Ag, ki so označeni z biotinom in rutenijevim kompleksom. V prvem koraku pride do vezave Ab iz testnega vzorca z Ag iz reagenta in se oblikuje imunski kompleks. V naslednjem koraku imunski kompleks reagira s kroglicami, obloženimi s streptavidinom, preko reakcije "biotin-streptavidin". Po drugi inkubaciji se reakcijska zmes prenese v

merilno celico. Imunski kompleksi se vežejo na elektrode. Nevezani vzorec in reagent se spereta. V ECL reakciji je konjugat derivat rutenija in ECL reakcija je električno stimulirana. Meri se količina oddane svetlobe, ki je sorazmerna količini analita v testnem vzorcu. Koncentracija Ab se ovrednoti in izračuna s pomočjo kalibracijske krivulje (18).



Slika 2: Potek MEIA testa

(prirejeno po viru: http://www.drnanandpartners.com/wp-content/uploads/2014/05/learning_immunoassay.pdf, dostopno: 08. 10. 2014)



Slika 3: ECLIA metoda – reakcija imunskega kompleksa z mikrodelcem

(prirejeno po viru: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/gaertner-markus-2004-09-24/HTML/image008.jpg>, dostopno: 08.10.2014)

2. NAMEN DELA

Motnje menstrualnega cikla zahtevajo stopenjsko diferencialno diagnostiko. Del te diagnostike je tudi določanje serumskih koncentracij gonadotropnih hormonov in Prl. Za določanje hormonov so dostopne različne imunokemijske metode, ki se razlikujejo v specifičnosti in občutljivosti, hitrosti merjenja rezultatov, težavnosti izvedbe in končno tudi v ceni. Zato je pomembno, da vsak laboratorij glede na zahteve dela in lastne možnosti izbere ustrezno metodo. Katero metodo in merilni instrument bomo izbrali, je odvisno od več dejavnikov. Poznati moramo lastnosti analitov, ki jih določamo, lastnosti posameznih metod in dostopno merilno tehnologijo.

S časom se razvijajo inovativne tehnologije, ki ponujajo različne prednosti. Omogočajo izvajanje testov visoke kakovosti in hitrih rezultatov. Po drugi strani se v laboratorijih pojavlja potreba po zamenjavi zastarelih merilnih instrumentov z novimi, učinkovitejšimi.

V laboratoriju Zdravstvenega doma dr. Franca Ambrožiča bomo zamenjali imunokemični analizator Axsym proizvajalca Abbott z analizatorjem Cobas e 411 proizvajalca Roche. Abbottov analizator uporablja MEIA metodo, analizator proizvajalca Roche pa ECLIA inovativno metodo. Na obeh analizatorjih bomo merili serumske vrednosti gonadotropnih hormonov (Fsh, Lh) in Prl v vzorcih ginekoloških pacientk Zdravstvenega doma dr. Franca Ambrožiča v Postojni. V nalogi bomo ugotavljali, ali sta merilna instrumenta Axsym in Cobas e 411 med seboj izmenljiva in če lahko uporabljamo enega namesto drugega. Zanima nas, kako dobro se ujemanje vrednosti na obeh aparatih. Najprej bomo ugotavljali točnost in natančnost merjenja Fsh, Lh in Prl na Cobasu e 411 z namenom verifikacije nove metode, nato pa bomo ugotavljali primerljivost med aparatoma. Za ocenjevanje ujemanja moramo izbrati prave relevantne attribute merjenja in povedne načine njihovega prikaza. Dobljene rezultate in ujemanje metod za vse tri parametre bomo nazorno grafično prikazali in opisno ocenili s pomočjo dveh praktičnih in enostavnih statističnih metod: Bland-Altmanovo metodo (diagram razlik) in Krouwer-Montijevo metodo (gorski diagram).

3. METODE

3.1 Testni vzorci

Primerni vzorci za določanje koncentracij Fsh (19, 7), Lh (20, 8) in Prl (21, 9) so humani krvni serum ali plazma (zbrana v epruveto z Na-heparinom ali s trikalijevo etilendiamintetraocteno kislino (K_3 EDTA)). Fsh, Lh in Prl smo določali v krvnih serumih. Pacientkam, ki so bile napotene iz ginekoloških ambulant in so imele naročene prej omenjen hormone, smo z venskim odvzemom po standardiziranem postopku (22) odvzeli kri v epruveto z ločevalnim gelom in brez antikoagulant. Vzorce smo pustili na stojalu 30 minut in jih potem centrifugirali 10 minut na 3000 obratov/min. Preverili in uklonili smo mehurčke, ki bi motili analize. Izvedli smo analize hormonov na analizatorju Axsym in analizatorju Cobas e 411. Potrebno je poudariti, da smo z vsakim vzorcem, reagentom, kalibratorjem in kontrolo rokovali kot s potencialno kužnim materialom. Koncentracije Fsh smo merili v 37 vzorcih, Lh v 42 vzorcih in Prl v 45 vzorcih. Za rutinsko merjenje posameznega hormona je potrebno vsaj 150 μ L vzorca (19, 20, 21). Vzorci za določitev omenjenih hormonov so stabilni 24–48 ur na temp. 2–8°C (19, 7). Vzorci, zmrznjeni na -20 °C, so stabilni 6 mesecov (7, 8, 9). Da bi se zmanjšal učinek izhlapevanja, je priporočena izvedba vseh analiz znotraj dveh do treh ur od vstavljanja v analizator (19, 7). Po končanih analizah smo vzorce, porabljene reagente, kontrole in kalibratorje primerno odložili med infektivni odpad.

3.2 Merilni instrumenti in reagenti

Serumske koncentracije Fsh, Lh in Prl smo določili na dveh imunoloških analizatorjih: 1. Axsym, proizvajalca Abbott (Abbott Laboratories Diagnostics Division, (slika 4))

2. Cobas e 411, proizvajalca Roche (Roche Diagnostics GmbH, slika (5)).

Uporabili smo tovarniško pripravljene reagente, raztopine in dodatni material. Pripravo reagentov in potrebnega materiala smo izvedli po navodilih in priporočilih proizvajalca.

3.2.1 Imunološki analizator Axsym

Imunološki analizator Axsym za serumsko določanje Fsh, Lh in Prl uporablja MEIA imunokemijski test (princip testa je opisan v poglavju "Metode določanja hormonov"). V nadaljevanju besedila sledi opis postopka merjenja analitov, potrebnih reagentov, raztopin,

kalibracijskega in kontrolnega materiala, ki smo ga uporabili za izvedbe testa oz. za določanje koncentracij hormonov.



Slika 4: Imunološki analizator Axsym, Abbott Diagnostics

(vir: http://www.alibaba.com/product-detail/AXSYM-ABBOTT-Analyzer-Original-Reagents_106145798.html, dostopano: 08.10.2014)

3.2.1.1 Princip merjenja Fsh, Lh in Prl

V reakcijske posodice, ki jih vstavimo v analizator, se odpipetirajo vzorci in reagenti, ki so potrebni za določanje Fsh hormona (19). Posodice se prenesejo v analizni center, kjer sledi nadaljnje pipetiranje (19). Najprej se odpipetirajo vzorec, z anti- β Fsh obloženi mikrodenci in Tris pufer (19). Sledi vezava Fsh iz vzorca in mikrodencov, obloženih z anti- β Fsh, ki oblikujejo kompleks "Ab-Ag" (19). Alikvot reakcijske zmesi, ki vsebuje kompleks "Ab-Ag", vezan na mikrodence, se prenese na celični matriks (19). Mikrodenci se ireverzibilno vežejo na matriks iz steklenih vlaken (19). Nevezani material se izpere s pufrom za spiranje (19). V celični matriks se doda anti- α Fsh Ab, konjugirano z alkalno fosfatazo (19). Konjugat se veže na "Ab-Ag" kompleks (19). Celični matriks se ponovno izpere (19). Sledi dodajanje substrata 4-MUP v celični matriks (19). Dobljeni fluorescenčni produkt se meri z MEIA optičnim sistemom (19). Po podobnem postopku in principu poteka merjenje Lh in Prl, razlika je le v uporabljenih reagentih (20, 21).

3.2.1.2 Reagenti in dodaten material

Fsh reagenčni kit Axsym (za izvedbo 100 testov) vsebuje naslednje komponente (19):

- reagenčna steklenička 1: 1 steklenička (9,9 mL), ki vsebuje mikrodcelce, označene z mišjimi monoklonskimi Ab proti Fsh, in Tris pufer s proteinskimi stabilizatorji. Konzervans: natrijev azid.
- Reagenčna steklenička 2: 1 steklenička (13,4 mL), ki vsebuje konjugat, sestavljen iz kozjih poliklonskih Ab proti Fsh, in alkalne fosfataze, Tris pufer s proteinskimi stabilizatorji. Minimalna koncentracija: 0.1 µg/mL. Konzervans: natrijev azid.
- Reagenčna steklenička 3: 1 steklenička (17,3 mL) Wash Buffer tekočine, ki vsebuje surfaktant (snov, ki zmanjšuje površinsko napetost).
- Reagenčna steklenička 4: 1 steklenička (50,2 mL) Tris pufera z 0,3 M NaCl. Konzervansi: natrijev azid in protimikrobne učinkovine.

Lh reagenčni kit Axsym (reagenčni komplet za izvedbo 100 testov) vsebuje naslednje komponente (20):

- reagenčna steklenička 1: 1 steklenička (7,5 mL), ki vsebuje mikrodcelce, označene z mišjimi monoklonskimi Ab proti Lh, in Tris pufer. Konzervans: natrijev azid.
- Reagenčna steklenička 2: 1 steklenička (14,2 mL), ki vsebuje konjugat sestavljen iz kozjih poliklonskih Ab proti Lh in alkalne fosfataze, Tris pufer s proteinskimi stabilizatorji. Minimalna koncentracija: 0,5 µg/mL. Konzervans: natrijev azid.
- Reagenčna steklenička 3: 1 steklenička (26,5 mL) Tris pufera z 0.3 M NaCl. Konzervansi: natrijev azid in protimikrobne učinkovine.

Prl reagenčni kit Axsym (za izvedbo 100 testov) vsebuje naslednje komponente (21):

- Reagenčna steklenička 1: 1 steklenička (9,3 mL), ki vsebuje mikrodcelce, označene z mišjimi monoklonskimi Ab proti Prl, in Tris pufer. Konzervans: natrijev azid.
- Reagenčna steklenička 2: 1 steklenička (9,0 mL), ki vsebuje konjugat, sestavljen iz zajčjih poliklonskih Ab proti Prl, in alkalne fosfataze, Tris pufer s proteinskimi stabilizatorji. Minimalna koncentracija: 0.1 µg/mL. Konzervans: natrijev azid.

- Reagenčna steklenička 3: 1 steklenička (11,4 mL) Assay Diluent tekočine, zajčji serum. Konzervans: natrijev azid.

Dodatni material in reagente prikazuje preglednica II.

Preglednica II: Dodatni material, reagenti in raztopine, ki so potrebne za določanje Fsh, Lh in Prl na analizatorju Axsym

Dodatni material
Reakcijske posodice (ang. reaction vessels)
Celični matriksi (ang. matrix cells)
Vzorčne posodice (ang. sample cups)
Ostali reagenti in raztopine
Raztopina 1 MUP: 4 stekleničke (1 steklenička = 230 mL). Raztopina 1 MUP vsebuje 4-metilumbeliferil fosfat, 1.2 mM in adenzin monofosfat (AMP) pufer. Konzervans je natrijev azid. Shranjuje se na temp. 2–8 °C. Ne sme se zamrzniti, ko se vzame iz hladilnika, je potrebno takoj porabiti. V reag. krožniku analizatorja je uporabna 14 dni.
Raztopina 3 Matrix Cell Wash: 4 stekleničke (1 steklenička = 1000 mL). Raztopina 3 vsebuje 0,3 M NaCl in Tris pufer. Konzervansi so: natrijev azid in protimikrobne učinkovine.
Raztopina 4 Line Diluent: 1 steklenička (V=10 L). Raztopina 4 vsebuje 0.1 M fosfatnega pufera. Konzervansi so: natrijev azid in protimikrobne učinkovine. Shranjuje se na 15–30°C.
Probe Cleaning Solution: 4 stekleničke (1 steklenička=110 mL)/2 steklenički (1 steklenička = 220 mL). Raztopina vsebuje 2 % tetraetilamonijev hidroksid (TEAH). Shranjuje se na 15–30 °C.

Priprava reagentov: reagenti, ki smo jih uporabili za določanje analitov, so bili že pripravljene. Vzeli smo jih iz hladilnika in jih takoj dali v reagenčni krožnik. **Shranjevanje in stabilnost reagentov:** reagenčne komplete smo po navodilih proizvajalca hranili na temperaturi 2–8 °C v hladilniku (19, 20, 21). Stabilni so do rokov, ki so označeni na embalaži (19, 20, 21).

3.2.1.3 Kalibracijski material

Za merjenje Fsh smo uporabili komplet, ki vsebuje 2 steklenički (vsaka 4 mL) Fsh kalibratorja (19). Kalibracijska raztopina 1 vsebuje predelani goveji serum, kalibracijska raztopina 2 pa človeški Fsh, ki je pripravljen in predelan v govejem serumu (19). Kot

konzervans je uporabljen natrijev azid (19). Koncentracija Fsh v kalibracijskih raztopinah je določena z Fsh 1. mednarodnim standardom (IS) 92/510 Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) in znaša: **0 IU/L** v kalibracijski **raztopini 1** in **100 IU/L** v kalibracijski **raztopini 2** (19).

Za merjenje Lh smo uporabili komplet, ki vsebuje 2 steklenički (vsaka 4 mL) Lh kalibratorja (20). Kalibracijska raztopina 1 vsebuje telečji serum, kalibracijska raztopina 2 pa človeški Lh, ki je pripravljen in predelan v telečjem serumu (20). Kot konzervans je uporabljen natrijev azid (20). Koncentracije Lh v kalibracijskih raztopinah so določene z WHO Lh 2. IS 80/552 standardom (20): **0 IU/L** v kalibracijski **raztopini 1** in **25 IU/L** v kalibracijski **raztopini 2**.

Za merjenje Prl smo uporabili komplet, ki vsebuje 2 steklenički (vsaka 4 mL) Prl kalibratorja (21). Kalibracijska raztopina 1 vsebuje Tris pufer s proteinskimi stabilizatorji, kalibracijska raztopina 2 pa človeški Prl in Tris pufer s proteinskimi stabilizatorji (21). Kot konzervans je uporabljen natrijev azid (21). Koncentracije Prl v kalibracijskih raztopinah so določene z WHO Prl 3. IS 84/500 standardom: **0 µg/L** v kalibracijski **raztopini 1** in **30 µg/L** v kalibracijski **raztopini 2** (21).

Predhodno pripravljene kalibracijske raztopine smo rahlo premešali. V prvo vzorčno posodico (ang. sample cup) smo nakapljali 350 µL kalibracijske raztopine 1, v drugo pa 350 µL kalibracijske raztopine 2. Postopek je isti pri vseh treh parametrih. Pri izbiri volumna smo upoštevali priporočila proizvajalca (19, 20, 21). Po uporabi kalibracijske raztopine shranjujemo na temp. 2–8°C (19, 20, 21). Stabilne so do izteka roka, ki je označen na embalaži (19, 20, 21).

3.2.1.4 Kontrolni material

Kontrolne raztopine so razdeljene v 3 stekleničke (3 nivoji: nizek **L** (ang. low), srednji **M** (ang. medium) in visok **H** (ang. high) (19)). Volumen kontrolne raztopine v vsaki steklenički je 8 mL (19). Kot konzervans je uporabljen natrijev azid (19). Tovarniško pripravljene kontrole smo pred uporabo rahlo premešali. Pri tem smo bili pozorni na nastanek mehurčkov, ki bi motili analizo. V vsako vzorčno posodico smo kanili 200 µL posamezne kontrolne raztopine. Pri izbiri volumna smo upoštevali priporočila proizvajalca (19). Postopek je isti pri vseh treh parametrih (20, 21). Po uporabi kontrolne raztopine shranjujemo na temp. 2–8°C (19). Stabilne so do izteka roka, ki je označen na embalaži

(19). **Kontrolne raztopine za Fsh** vsebujejo humani Fsh, pripravljen v telečjem serumu (19). Razpon koncentracij Fsh v kontrolnem materialu **L** je **3.5–6.5 IU/L** (povprečna vrednost (povp. vr.) je 5 IU/L), v kontrolnem materialu **M** je **18–32 IU/L** (povp. vr. je 25 IU/L) in v kontrolnem materialu **H** je **53–97 IU/L** (povp. vr. je 75 IU/L) (19).

Kontrolne raztopine za Lh vsebujejo humani Lh, pripravljen v govejem serumu (20). Razpon koncentracij Lh v kontrolnem materialu **L** je **3.5–6.5 IU/L** (povp. vr. je 5 IU/L), v kontrolnem materialu **M** je **30–50 IU/L** (povp. vr. je 40 IU/L) in v kontrolnem materialu **H** je **57–103 IU/L** (povp. vr. je 80 IU/L (20)). **Kontrolne raztopine za Prl** vsebujejo humani Prl in Tris pufer s proteinskimi stabilizatorji (21). Razpon koncentracij Prl v kontrolnem materialu **L** je **6–10 µg/L** (povp. vr. 8 µg/L), v kontrolnem materialu **M** je **16–24 µg/L** (povp. vr. je 20 µg/L) in v kontrolnem materialu **H** je **32–48 µg/L** (povp. vr. je, oz. 40 µg/L (21)).

3.2.1.5 Rezultati in merilna območja

Rezultate Fsh, Lh in Prl, ki jih je podal analizator na osnovi kalibracijske krivulje (19, 20, 21), smo vnesli v Microsoft (MS) Office Excel in jih ustrezno statistično ovrednotili (priloga 1, priloga 3, priloga 5). **Merilno območje za Fsh** je **0,37–150 IU/L** (19), za **Lh** je **0,5–250 IU/L** (20) in za **Prl** je **0,6–200 µg/L** (21). Spodnje meje merilnih območij predstavljajo najnižje koncentracije analitov, ki jih sistem lahko izmeri/zazna (19). Koncentracije, ki presegajo zgornjo mejo merilnih območij, je potrebno redčiti po protokolu za ročno redčenje vzorcev, saj sistem nima možnosti avtomatiziranega redčenja (19).

3.2.1.6 Referenčne vrednosti

Referenčne vrednosti za Fsh, ki jih določa proizvajalec (19), so prikazane v preglednici III. Vrednosti in območja so dobljena na osnovi študije, ki je zajemala 150 zdravih moških, 35 žensk v postmenopavznem obdobju (niso bile na nadomestni hormonski terapiji) in 44 zdravih žensk v normalnem spolnem ciklu (19).

Preglednica III: Referenčne vrednosti: Fsh , Axsym System, Abbott Diagnostics

Spol in faza cikla	Število vključenih v študijo (N)	Povprečje	Razpon vrednosti (IU/L)
Ženske v folikularni fazi	144	4.94	3.09–7.90
Ženske v sredini menstrualnega cikla	42	10.39	2.27–18.51
Ženske v luteinski fazi	138	2.76	1.38–5.52
Ženske v postmenopavznem obdobju	35	61.15*	30.57–106.32
Moški	150	3.77	1.13–12.51

Referenčne vrednosti za Lh, ki jih določa proizvajalec (20), so prikazane v preglednici IV. Vrednosti in območja so dobljena na osnovi študije, ki je zajemala 19 zdravih moških, 26 žensk v postmenopavznem obdobju in 26 zdravih žensk v normalnem spolnem ciklu (20).

Preglednica IV: Referenčne vrednosti vrednosti: Lh , Axsym System, Abbott, Diagnostics

Spol in faza cikla	Število vključenih v študijo (N)	Povprečje	Razpon vrednosti (IU/L)
Ženske v folikularni fazi	96	6	1–18
Ženske v sredini menstrualnega cikla	21	44	24–105
Ženske v luteinski fazi	92	5	0.4–20
Ženske v postmenopavznem obdobju	26	34	15–62
Moški	19	5	2–12

Referenčne vrednosti za Prl, ki jih določa proizvajalec (21), so prikazane v preglednici V. Vrednosti in območja so dobljena na osnovi študije, ki je zajemala 189 navidezno zdravih posameznikov (ženske in moški (21)).

Preglednica V: Referenčne vrednosti vrednosti: Lh , AxSYM System, Abbott, Diagnostics

Spol	Število vključenih v študijo (N)	Povprečje	Razpon vrednosti (µg/L)
Ženske	102	7.97	1.39–24.20
Moški	87	5.60	1.61–18.77



Slika 5: Imunološki analizator Cobas e 411, Roche Diagnostics GmbH

(vir: <http://www.adriamed.com.mk/en/products/roche-diagnostics/cobas-e-411/>, dostopno: 08.10.2014)

3.2.2.1 Princip merjenja Fsh, Lh in Prl

Obstajajo 3 oblike testa, ki se lahko izvajajo na Cobas e 411 analizatorju (18): kompetitivna oblika, "sendvič" oblika (eno/dvostopenjska), in "premostitvena" oblika (Metode določanja hormonov: ECLIA (18)). Koncentracije hormonov smo merili z dvostopenjsko "sendvič" metodo, ki se uporablja za merjenje koncentracij analitov večje molekulske mase (18). Sledi opis postopka in principa meritve na primeru Fsh. Izvedba testa je potekala 18 minut na naslednji način (7): tekom prve inkubacije 40 µL vzorca, monoklonsko Fsh-specifično Ab, obloženo z biotinom, in monoklonsko Fsh-specifično Ab, označeno z rutenijevim kompleksom, oblikujejo "sendvič kompleks". V drugi inkubaciji po dodatku mikrodelcev, ki so obloženi s streptavidinom, se kompleks veže na trdno fazo. To omogoča interakcija biotina in streptavidina. Reakcijska zmes se nato aspirira v merilno celico. Mikrodelci se "magnetsko ulovijo" na površino elektrod. Nevezane snovi se izperejo s tekočino ProCell. Z dovajanjem napetosti elektrodam se

spodbudi kemiluminiscenčna emisija, ki se meri na fotopomnoževalcu. Pridobivanje rezultatov omogoča kalibracijska krivulja, ki jo analizator specifično generira z 2-točkovno kalibracijo in "master krivuljo" (črna koda reagenta). Postopek in princip merjenja Lh in Prl potekata tako kot merjenje Fsh (8, 9). Razlika je v volumnu vzorca, ki v primeru Lh znaša 20 µL (8) in v primeru Prl 10 µL (9), ter v sestavi reagenčnega kompleta (8, 9).

3.2.2.2 Reagenti in dodaten material

Fsh reagenčni komplet Cobas e 411 vsebuje naslednje komponente (7):

- M: mikrodenci označeni s streptavidinom (bel pokrov), 1 steklenička (6,5 mL): mikrodenci označeni s streptavidinom (0,72 mg/mL); konzervans.
- R1: anti-Fsh Ab označeno z biotinom (siv pokrov), 1 steklenička (10 mL): biotinizirana monoklonska (mišja) anti-Fsh Ab (0,5 mg/L), 2-(N-morfolino) etansulfonska kislina (MES pufer 50 mmol/L, pH 6,0); konzervans.
- R2: anti-FSH-Ab~Ru (bpy)₃²⁺ (črn pokrov), 1 steklenička (10 mL): monoklonska anti-Fsh mišja Ab označena z rutenijevim kompleksom (0,8 mg/L), MES pufer (50 mmol/L, pH 6,0); konzervans.

Lh reagenčni komplet Cobas e 411 vsebuje naslednje komponente (8):

- M: mikrodenci označeni s streptavidinom (bel pokrov), 1 steklenička (6,5 mL): mikrodenci označeni s streptavidinom (0,72 mg/mL); konzervans.
- R1: anti-Lh Ab označeno z biotinom (siv pokrov), 1 steklenička (10 mL): biotinizirana monoklonska mišja anti-Lh Ab (2,0 mg/L), Tris pufer (50 mmol/L, pH 8,0); konzervans.
- R2: anti-Lh-Ab~Ru (bpy)₃²⁺ (črn pokrov), 1 steklenička (10 mL): monoklonska anti-Lh mišja Ab označena z rutenijevim kompleksom (0,3 mg/L), Tris pufer (50 mmol/L, pH 8,0); konzervans.

Prl reagenčni komplet Cobas e 411 vsebuje naslednje komponente (9):

- M: mikrodenci označeni s streptavidinom (bel pokrov), 1 steklenička (6,5 mL): mikrodenci označeni s streptavidinom (0,72 mg/mL); konzervans.
- R1: anti-Prl Ab označeno z biotinom (siv pokrov), 1 steklenička (10 mL): biotinizirana monoklonska mišja anti-Prl Ab (0,7 mg/L), fosfatni pufer (50 mmol/L, pH 7,0); konzervans.

- R2: anti-Prl-Ab~Ru (bpy)₃²⁺ (črn pokrov), 1 steklenička (10 mL): monoklonska anti-Prl mišja Ab označena z rutenijevim kompleksom (0,35 mg/L), fosfatni pufer (50 mmol/L, pH 7,0); konzervans.

Priprava reagentov: predhodno pripravljene reagente smo vzeli iz hladilnika in jih vstavili v reagenčni krožnik. Pri tem smo se izogibali penjenju, ki bi motilo potek analize (7). **Shranjevanje in stabilnost reagentov** (7, 8, 9): po uporabi smo reagente shranili na temperaturo 2–8°C. Po odprtju so reagenčni kiti stabilni 12 tednov, zaprti pa do datuma poteka roka, ki je označen na embalaži. V analizatorju so stabilni 8 tednov. Sledi opis potrebnega **odatnega material, raztopin in reagentov** (preglednica VI): **ProCell** (pH 6,8) je sistemska raztopina, ki vsebuje fosfatni pufer (300 mmol/L), TPA (180 mmol/L), detergent (< 0,1 % ali 0,1 %) in konzervans (23). Uporablja se za generiranje elektrokemijskega signala znotraj sistema, za spiranje mikrodlecev, vezanih na streptavidin iz merilne celice, in prenašanje reakcijske zmesi (23). **CleanCell** (pH 13,2) raztopino uporabljamo za čiščenje pretočnega sistema analizatorja in merilne celice po vsaki meritvi (24). Vsebuje kalijev hidroksid (KOH, 176 mmol/L), detergent (< 0,1 % ali 0,1 %) in je dražilna snov (24). ProCell in CleanCell se shranjujeta na temp. 15–20°C in sta uporabna do datuma, ki je označen na embalaži (23, 24). Z demineralizirano vodo smo pripravili 10 % raztopino **SysWash**, ki se uporablja za spiranje sistema (7). **SysClean** je tekočina, ki se uporablja za 2-tedensko vzdrževanje analizatorja (7).

Preglednica VI: Dodaten material in raztopine, ki smo jih uporabili za določanje Fsh, Lh in Prl na Cobasu e 411

Reagenčni, kalibracijski in kontrolni material
Fsh reagenčni komplet (za izvedbo 100 testov). Lh reagenčni komplet (za izvedbo 100 testov). Prl reagenčni komplet (za izvedbo 100 testov).
Fsh CalSet II (4 stekleničke: 2 steklenički Fsh Cal 1 – vsaka vsebuje 1.0 mL kalibratorja 1; 2 steklenički FSH Cal 2 – vsaka vsebuje 1.0 mL kalibratorja 2). Lh CalSet II (4 stekleničke: 2 steklenički Lh Cal 1 – vsaka vsebuje 1.0 mL kalibratorja 1; 2 steklenički LH Cal 2 – vsaka vsebuje 1.0 mL kalibratorja 2). Prl CalSet II (4 stekleničke: 2 steklenički Prl Cal 1 – vsaka vsebuje 1.0 mL kalibratorja 1; 2 steklenički PRL Cal 2 – vsaka vsebuje 1.0 mL kalibratorja 2).
PreciControl Universal (za 4 x 3mL) kontrolni komplet: PC U1 (2 steklenički : 2 x 3.0 mL kontrolnega

seruma) in PC U2 (2 steklenički: 2 x 3.0 mL kontrolnega seruma).
Dodatne raztopine/tekočine
ProCell (6 x 380mL) – spiralna tekočina
CleanCell (6 x 380mL) – tekočina za čiščenje merilne celice
SysWash (1 x 500 mL) – dodatek za spiralno tekočino
SysClean (5 x 100mL) – tekočina za sistemsko čiščenje analizatorja
Dodatni material
CalSet Vials – posodice za kalibracijski material in priložene črtne kode
ControlSet Vials – posodice za kontrolni material in priložene črtne kode
Sample Cups – vzorčne posodice
AssayCup (60 x 60) – reakcijske posodice
AssayTip (30 x 120) – nastavki za pipetiranje
Adapter za SysClean tekočino
Waste posoda – posoda za trdi odpad (nastavki za pipetiranje, reakcijske posodice)
Proizvajalec: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3.2.2.3 Kalibracijski material

Za merjenje Fsh smo uporabili liofilizirani Fsh CalSet II (4 x 1 mL), ki vsebuje konjski serum, ki mu je dodan humani Fsh v dveh koncentracijskih razponih: ~ **1.0 IU/L** kalibracijska raztopina 1 in ~ **55.0 IU/L** kalibracijska raztopina 2 (25). Metoda je standardizirana po encimsko-imunski metodi določanja Fsh (2. International reference preparation (IRP) WHO referenčni standard 78/549 (25)).

Za merjenje Lh smo uporabili liofilizirani Lh CalSet II (4 x 1 mL), ki vsebuje humani serum, ki mu je dodan humani Lh v dveh koncentracijskih razponih: ~ **1.0 IU/L** kalibracijska raztopina 1 in ~ **45.0 IU/L** kalibracijska raztopina 2 (26). Metoda je standardizirana po 2. mednarodnem standardu za določanje LH (Nacionalni inštitut za biološke standarde in kontrole (NIBSC), 80/552, (26)).

Za merjenje Prl smo uporabili liofilizirani, pufferirani Prl CalSet II (4 x 1,0 mL), ki vsebuje konjski serum, ki mu je dodan rekombinantni Prl v dveh koncentracijskih razponih: ~ **0,09 µg/L** kalibracijska raztopina 1 in ~ **94,0 µg/L** kalibracijska raztopina 2 (27). Metoda je

standardizirana po 3. IRP WHO referenčnem standardu 84/500 (27). Pred uporabo smo kalibracijske materiale raztopili v 1 mL destilirane vode in jih pustili 20 do 25 minut na temperaturi 20–25 °C, da se stabilizirajo (25, 26, 27). Naredili smo alikvot po 250 µL. Za takojšnjo kalibracijo vsakega hormona smo uporabili 250 µL, preostale alikvot smo shranili na temperaturo -20 °C. Vsak reagenčni komplet, ki je označen s črtnimi kodami, vsebuje specifično informacijo o kalibraciji za določeni lot reagenta (25). Po kalibraciji smo dobili ustrezno krivuljo. Vse parametre smo kalibrirali po odprtju vsakega reagenčnega kompleta z novo "lot številko" (25, 26, 27). Proizvajalec priporoča izvajanje kalibracije po enem mesecu (pred uporabo istega reagenčnega kompleta z isto lot številko), po sedmih dneh (kadar uporabljamo isti reagenčni komplet), po potrebi (kadar so kontrole izven določenih mejah (25)).

3.2.2.4 Kontrolni material

Uporabili smo Elecsys PCU kontrolni set, v dveh koncentracijskih nivojih (nizka in visoka vrednost) za izvajanje kontrole kakovosti in nadzor točnosti ter natančnosti meritve naših parametrov (28). Set vsebuje humani, liofilizirani serum, ki smo ga raztopili v 3 mL destilirane vode (28). Material smo rahlo premešali in pustili stati na temperaturi 20–25°C, 30 minut, da se popolnoma raztopi in homogenizira. Tako pripravljen material smo razdelili v štiri alikvot (en alikvot vsebuje 500 µL raztopljenega kontrolnega seruma) v zato priložene in s črtnimi kodami označene posodice za oba nivoja (PC U1 in PC U2). En par kontrol smo uporabili, ostale pa smo shranili na -20 °C. Kontrolo smo izvajali vsak dan pred merjenjem konc. Fsh/Lh/Prl v vzorcih in po kalibraciji. Neodprt kontrolni set se shranjuje v hladilniku do poteka roka uporabe (28). Alikvoti shranjeni na temperaturi -20 °C so stabilni 1 mesec, na temperaturi 2–8°C pa 3 dni (28). Tisti, ki so v analizatorju, so stabilni do 5 ur (28).

Razpon koncentracij Fsh v kontrolnem materialu **L** je **13,02–24,18 IU/L** (povp. vr. 18,6 IU/L), v kontrolnem materialu **H** **36,89–68,51 IU/L** (povp. vr. 52,7 IU/L).

Razpon koncentracij Lh v kontrolnem materialu **L** je **8,30–12,71 IU/L** (povp. vr. 10,5 IU/L), v kontrolnem materialu **H** **41,16–63,04 IU/L** (povp. vr. 52,1 IU/L).

Razpon koncentracij Prl v kontrolnem materialu **L** je **8,91–13,65 µg/L** (povp. vr. 11,28 µg/L), v kontrolnem materialu **H** **32,30–49,48 µg/L** (povp. vr. 40,89 µg/L).

3.2.2.5 Rezultati in merilna območja

Analizator samodejno izračuna koncentracije analitov v vzorcu in jih poda v mIU/mL ali IU/L enotah (Fsh in Lh). Rezultate Prl poda v μ IU/mL ali mIU/L ali v ng/mL. **Pri Fsh** ikterija (bilirubin < 64 mg/dL ali < 1094 μ mol/L), hemoliza (hemoglobin (Hb) < 1,0 g/dL ali < 0.621 mmol/L), lipemija (endogeni lipidi < 1900 mg/dL) in biotin (< 246 nmol/L ali < 60 ng/mL) ne vplivajo na rezultate testa (26). **Pri Lh** ikterija (bilirubin < 66 mg/dL ali < 1129 μ mol/L), hemoliza (Hb < 1,0 g/dL ali < 0.621 mmol/L), lipemija (endogeni lipidi < 1900 mg/dL) in biotin (< 205 nmol/L ali < 50 ng/mL) ne vplivajo na rezultate testa (8). **Pri Prl** ikterija (bilirubin < 30 mg/dL ali < 513 μ mol/L), hemoliza (Hb < 1,5 g/dL ali < 0.932 mmol/L), lipemija (endogeni lipidi < 1500 mg/dL) in biotin (< 164 nmol/L ali < 40 ng/mL) ne vplivajo na rezultate testa (9). Rezultate izmerjenih parametrov smo vnesli v MS Office Excel in jih ustrezno statistično ovrednotili (priloge 1, 3, 5). Merilno območje je opredeljeno kot *spodnja meja zaznavanja* in *maksimum "Master krivulje"* (7). **Merilno območje za Fsh in Lh** je isto: **0,100–200 IU/L** (7, 8). Vrednosti, ki so pod spodnjo mejo zaznavanja, analizator poda kot < 0,100 IU/L (7, 8). Vrednosti, ki presegajo merilno območje, poda kot > 200 IU/L (7, 8). **Merilno območje za Prl** je **0,0470–470,00 μ g/L** (9)). Vrednosti, ki so pod spodnjo mejo zaznavanja, analizator poda kot < 0,0470 μ g/L (9). Vrednosti, ki presegajo merilno območje, poda kot > 470 μ g/L (9). Redčenje vzorcev ni potrebno zaradi širokih merilnih območji (7, 8, 9).

3.2.2.6 Referenčne vrednosti

Referenčne vrednosti za Fsh, ki jih določa proizvajalec, so prikazane v preglednici VII (7). Vrednosti in območja so dobljena na osnovi študije, ki je zajemala 319 moških, 376 žensk v folikularni fazi cikla, 56 v ovulacijski, 349 v luteinski in 181 žensk v postmenopavznem obdobju (7).

Preglednica VII: Referenčne vrednosti: Fsh , Cobas e 411, Roche Diagnostics GmbH

Spol in faza cikla	Število vključenih v študijo (N)	Fsh (IU/L)		
		Percentile		
		50.	5.	95.
Ženske v folikularni fazi	376	6,9	3,5	12,5
Ženske v ovulacijski fazi	56	12,3	4,7	21,5

Ženske v luteinski fazi	349	3,6	1,7	7,7
Ženske v postmenopavznem obdobju	181	67,0	25,8	134,8
Moški	319	4,6	1,5	12,4

Referenčne vrednosti za Lh, ki jih določa proizvajalec, so prikazane v preglednici VIII (8). Vrednosti in območja so dobljena na osnovi študije, ki je zajemala 322 moških, 316 žensk v folikularni fazi cikla, 56 v ovulacijski, 280 v luteinski in 132 žensk v postmenopavznem obdobju (8).

Preglednica VIII: Referenčne vrednosti :Lh , Cobas e 411, Roche Diagnostics GmbH

Spol in faza cikla	Število vključenih v študijo (N)	Lh (IU/L)		
		Percentile		
		50.	5.	95.
Ženske v folikularni fazi	316	5,9	2,4	12,6
Ženske v ovulacijski fazi	56	30,8	14,0	95,6
Ženske v luteinski fazi	280	4,3	1,0	11,4
Ženske v postmenopavznem obdobju	132	29,1	7,7	58,5
Moški	322	4,0	1,7	8,6

Referenčne vrednosti za Prl, ki jih določa proizvajalec, so prikazane v preglednici IX (9). Vrednosti in območja so dobljena na osnovi študije, ki je zajemala 300 zdravih krvodajalcev: 102 moška in 198 žensk, ki niso noseče (9).

Preglednica IX: Referenčne vrednosti: Prl, Cobas e 411, Roche Diagnostics GmbH

Spol in faza cikla	Število vključenih v študijo (N)	Prl (µg/L)	
		Percentile	
		50.	2,5-97,5
Ženske (ki niso noseče)	198	10,6	4,79-23,3
Moški	102	7,30	4,04-15,2

3.3 Verifikacija ECLIA metode

Pred rutinsko uporabo nove metode jo je treba ovrednotiti: **validirati** in **verificirati** (29). Validacijo ECLIA metode je zagotovil proizvajalec, mi smo metodo le verificirali (29). V ta namen smo ugotavljali *natančnost* in *točnost* metode. *Natančnost metode* (ang. precision) nam pove stopnjo skladnosti med rezultati, ki smo jih dobili z merjenjem pod določenimi pogoji (ista metoda, enak poskusni material in oprema, isti laboratoriji in analitik (29)). Da bi ocenili natančnost naše metode, smo izvedli teste *ponovljivosti*, ki smo jih ovrednotili s koeficientom variacije (KV (29)). KV je relativna mera razpršenosti podatkov in se izraža kot kvocient med standardnim odklonom (SD) in aritmetično sredino (\bar{X} (29, 30)). SD je mera, ki opisuje razpršenost rezultatov in je definirana kot kvadratni koren iz variance (druge mere razpršenosti (29, 30)). \bar{X} je ena od mer centralnih vrednosti podatkov (29, 30). Predstavlja srednjo vrednost, ki je definirana kot vsota vseh vrednosti, deljena s številom enot, na katerih je bila spremenljivka izmerjena (29, 30). Kot vzorec smo uporabili "pool serum" človeškega izvora, ki smo ga naredili iz 10 serumskih vzorcev različnih pacientk (dobili smo 20 mL seruma). Tri dni zapored (13. 11., 14. 11. in 15. 11. 2012) smo izvajali po 6 meritev Fsh, Lh in Prl iz istega "pool seruma". Dobljene vrednosti smo vnesli v preglednico programa MS Office Excel. V istem programu smo izračunali povprečja, SD in KV. Analize smo izvajali v istem analizatorju (Cobas e 411), iz istega vzorca ("pool seruma"), z enakimi reagenti in materialom proizvajalca Roche Diagnostic. Postopke analize je izvajal isti analitik. KV, ki ga je podal proizvajalec, smo primerjali s KV, ki smo ga izračunali za posamezni parameter. Upoštevali smo priporočljiv kriterij za KV: 1 % do 5 % (31). V preglednici X so prikazani rezultati natančnosti (znotraj-serijska ponovljivost/within-run precision in meddnevna ponovljivost vzorcev izven serije/intermed. precision/total precision) za Fsh in Lh, ki jih je podal proizvajalec (7, 8). Rezultati natančnosti za Prl so prikazani v preglednici XI (9).

Preglednica X: Rezultati natančnosti za Fsh in Lh, proizvajalca Roche Diagnostics GmbH

Meritve na cobas e 411 analizatorju: Fsh in Lh		
	Znotraj serijska natančnost/ponovljivost/within-run precision	Meddnevna natančnost/ponovljivost vzorcev izven serije/Interm.precision (Fsh)/total precision (Lh)

Parameter	Vzorec	Povprečje (IU/L)	SD (IU/L)	KV (%)	SD (IU/L)	KV (%)
Fsh	Človeški serum 1	1.2	0.02	1.8	0.06	5.3
	Človeški serum 2	50.4	0.74	1.5	1.90	3.8
	Človeški serum 3	103	1.85	1.8	5.24	5.1
	PC U1	11.1	0.22	2.0	0.41	3.7
	PC U2	28.9	0.40	1.4	0.85	2.9
Lh	Človeški serum 1	0.54	0.01	1.8	0.03	5.2
	Človeški serum 2	27.19	0.21	0.8	0.54	2.0
	Človeški serum 3	50.72	0.41	0.8	1.01	2.0
	PC U1	9.38	0.11	1.1	0.19	2.0
	PC U2	44.82	0.42	0.9	0.83	1.9

- Za določanje natančnosti (ponovljivosti) so uporabili Elecsys reagente, človeške "pool serume" in kontrolni material PC U1 in PC U2. Postopek so izvedli po preoblikovanem protokolu (EP5-A, Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (CLSI:), in sicer 6 meritev dnevno, 10 dni zapored (n = 60 meritev).

Preglednica XI: Rezultati natančnosti za Prl, proizvajalca Roche Diagnostics GmbH

Meritve na cobas e 411 analizatorju: Prl						
Parameter	Vzorec	Povprečje (µg/L)	Znotraj serijska natančnost/ponovljivost/within-run precision		Meddnevna natančnost/ponovljivost vzorcev izven serije/Interm.precision	
			SD (µg/L)	KV (%)	SD (µg/L)	KV (%)
Prl	Človeški serum 1	14.1	0.559	4.0	0.700	5.0
	Človeški serum 2	33.7	0.728	2.2	1.22	3.6
	Človeški serum 3	127	2.30	1.8	3.54	2.8
	Človeški serum 4	232	4.53	2.0	8.55	3.7
	PC U1	7.24	0.235	3.3	0.306	4.2
	PC U2	27.3	0.724	2.6	0.916	3.4

- Za določanje natančnosti so uporabili Elecsys reagente, človeške "pool serume" in kontrolni material PC U1 in PC U2. Postopek so izvedli po preoblikovanem protokolu (EP5-A, CLSI), in sicer 6 meritev dnevno, 10 dni zapored (n = 60 meritev).

Točnost (ang. accuracy) ali pravilnost metode nam pove, kako blizu je rezultat meritve njegovim resničnim oz. sprejeti vrednosti (referenčni vrednosti (29)). Izražamo ga kot napako (sistematično napako), ki določa pravilnost rezultata/postopka (29). Napaka je lahko absolutna (E) ali pa relativna (RE (29)). Absolutna napaka pomeni razliko med izmerjeno (O) in sprejeto (referenčno/ciljno (C)) vrednostjo (C, E = O-C (29)). Relativno napako izražamo v odstotkih proti sprejeti vrednosti, ki jo moramo poznati (enačba 1,(29)). Z namenom da ugotovimo, če bomo z uporabo ECLIA metode dobili pravilne rezultate, smo analizirali kontrolni material PC U, in sicer na obeh nivojih: PC U1 in PC U2. V istem kontrolnem materialu smo izvedli 20 meritev konc. Fsh, Lh in Prl ter spremljali, če smo dobili predpisane rezultate (rezultate znotraj referenčnih območji za oba nivoja). Izračunali smo povprečja, SD, KV in RE (enačba 1) za posamezni parameter. Iz vrednosti RE smo dobili podatke, koliko naše povprečne vrednosti odstopajo od povprečnih vrednosti, ki jih je podal proizvajalec. Natančnost in točnost smo določili po delovnih navodilih (ZDM) Službe za laboratorijsko diagnostiko: Uvajanje preiskave v rutinsko delo (31).

Enačba 1: Izračun relativne napake (29)

$$RE = ((X_{izmjerena} - X_{ciljna}) / X_{ciljna}) \times 100$$

RE: relativna napaka

$X_{izmjerena}$: povp. vrednosti, ki smo jih izmerili

X_{ciljna} : povp. vrednosti, ki ga je podal proizvajalec

3.4 Statistične metode za vrednotenje ujemanja rezultatov dveh različnih analitskih metod

V medicinskih laboratorijih se zelo pogosto zamenjujejo stari merilni instrumenti z novimi, ki so preprostejši, cenovno ugodnejši, hitrejši ali kako drugače primernejši. Da bi lahko uporabili en analizator namesto drugega, moramo oceniti, kako dobro se ujemajo z njima izmerjene vrednosti (32). Obstajajo različni pristopi in metode za ocenjevanje ujemanja.

Pogosto uporabljani metodi sta korelacija in linearna regresija, čeprav včasih zanju nista primerna (32). Zato smo v nalogi uporabili alternativni pristop ocenjevanja ujemanja rezultatov, ki temelji na grafičnih tehnikah, prikazih in enostavnejših izračunih (32).

3.4.1 Popolno ujemanje rezultatov

"Popolno ujemanje pomeni enako točnost in natančnost dveh metod (32)." Pri našem merjenju je bistveno, da so dobljene vrednosti meritve čim bližje resnični (referenčni vrednosti) R in da je variabilnost čim manjša. Pomemben je odnos med naslednjimi parametri: dobljena/izmerjena vrednost (x), resnična vrednost (R), sistematična napaka (pristranskost β) in slučajna napaka merjenja (ϵ); enačba 2 (32)). Vsaka dobljena vrednost se nekoliko razlikuje od resnične vrednosti. Ta odklon je posledica sistematične in slučajne napake (32). Prva napaka je posledica nepravilnega izvajanja merjenja ali je povezana z merilnim instrumentom, druga je posledica slučajnih, nepričakovanih vplivov in zato privzamemo, da je porazdelitev normalna in je srednja vrednost nula (32). Na tej osnovi pa ne moremo oceniti ujemanja (32). Vzrok za to je, da ne poznamo resnične vrednosti in ujemanje lahko ocenimo le s pomočjo omenjenih napak (32). Pri tem je pomembno, da je $\beta = 0$ in $\epsilon =$ čim manjši (32). Napake lahko ovrednotimo le z izračunom razlike parov meritev, ki smo jih izvedli v obeh analizatorjih z dvema različnima metodama (32). Če pa vzamemo kot resnično vrednost nek zlati standard merjenja, potem ne bi šlo več za ujemanje, temveč za vprašanje umerjanja novega analizatorja (32). Nas je zanimala praktična enakovrednost metod in ne umerjanje ali napovedovanje rezultatov ene metode na podlagi druge.

Enačba 2: Klasični model merjenja (32)

$$x = R + \beta + \epsilon$$

3.4.2 Korelacija in linearna regresija

Korelacija kot mera linearne povezanosti predstavlja odnos med kovarianco rezultatov obeh metod in zmnožkom njunih SD (enačba 3 (32)). Najpogosteje je izražena s Pearsonovim korelacijskim koeficientom (enačba 3 (32)). Tako opisuje variabilnost rezultatov obeh metod v odnosu z variabilnostjo rezultatov vsake posamezne metode (32). Pearsonov koeficient korelacije ne zajema točnosti in variabilnosti razlik parov (natančnost (32, 33)). Posledica tega, da korelacija ne zajema točnosti, je, da lahko popolnoma

korelirajo rezultati ($\rho=1$), ki se sploh ne ujemajo (ne ležijo na črti enakosti, oz. so daleč od nje (32, 33)). Ko preverjamo metode, v glavnem uporabljamo celotni razpon vrednosti. Posledica tega je večja korelacija, ki pa nikakor ne pomeni dobrega ujemanja vrednosti (32). Zaradi naštetih razlogov lahko zaključimo, da korelacija ni toliko primerna za ocenjevanje ujemanja. Omogoča pa druga vrednotenja, kot je npr. primerjanje skupine rezultatov v celoti (32). *Linearna regresija* omogoča napovedovanje vrednosti ene spremenljivke na podlagi druge (32, 33). Razmerje med spremenljivkami, ki korelirajo, prikazuje linearna enačba 4 (konstanta k – naklon regresijske premice, n – presečišče na ordinatni osi (32)). Za ocenjevanje ujemanja ni primerna metoda, ker ne vključuje točnosti in natančnosti (32, 33). Iz vrednosti naklona premice in presečišča (naklon 1 kot domnevna ustreznica natančnosti in presečišče 0 kot domnevna ustreznica točnosti) ne moremo oceniti ujemanja za posamezne pare meritve (32). Možno je oceniti samo povprečno skladanje za skupino (32). Pri ocenjevanju ujemanja imata napako obe spremenljivki (32). Linearna regresija predpostavlja vrednosti neodvisne spremenljivke brez merske napake (32, 33). Poleg tega pri ocenjevanju ujemanja ne želimo napovedovati rezultatov ene metode iz rezultatov druge. Regresija je pomembno statistično orodje v drugih primerih primerjav (npr. umerjanje ali pa dejansko napovedovanje rezultatov ene metode na podlagi druge (32)).

Enačba 3: Pearsonov korelacijski koeficient (32)

$$\rho_{xy} = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y}$$

Enačba 4: Linearna regresija (32)

$$y = kx + n$$

3.5 Metoda Blanda in Altmana: diagram razlik

Statistična metoda, ki je najbolj primerna za ocenjevanje ujemanja in je postala standard, je metoda J. Martina Blanda in Douglasa G. Altmana (32). Metoda temelji na izračunih *povprečja vseh parov meritev* in *razlike vseh parov meritev*, ki sta izvedena na obeh analizatorjih (32). Povprečja se nanesejo na absciso (x os) in razlike na ordinato (y os) (33). "Zaradi tega, ker resnične vrednosti v posameznem paru meritve ne poznamo, pravita

avtorja, je njena najboljša ocena povprečje meritev (32)." Z razlikami posameznih parov meritev ocenimo variabilnost (32). Pristranskost (sistematično napako) ocenimo iz povprečja teh razlik (32). Naslednji korak je določitev 95-odstotnega intervala ujemanja/meji ujemanja (IU, enačba 5) in 95-odstotnega intervala zaupanja/meji zaupanja (IZ, enačba 6 (33). Pri tem so pomembni: *povprečje razlik* (μ), njihov *standardni odklon* (σ), *normalna porazdelitev razlik (napak)* in *število enot (N)/skupno štev.meritev* (32). "Ker sta ti meji ujemanja vzorčni oceni s svojo lastno standardno napako, je to napako treba upoštevati za natančno določitev razpona meja ujemanja (33). Njena velikost je odvisna od variabilnosti razlik in velikosti vzorca (33).

Enačba 5: Izračun 95-odstotnih meja ujemanja (IU) pri normalni porazdelitvi napak (32)

zgornja 95-odstotna meja ujemanja $IU = \mu + 1,96 \sigma$
spodnja 95-odstotna meja ujemanja $IU = \mu - 1,96 \sigma$

Enačba 6: Izračun 95-odstotnih meja zaupanja (IZ) pri normalni porazdelitvi napak (32)

zgornja 95-odstotna meja zaupanja $IZ = \mu + 1,96 \sigma/\sqrt{N}$
spodnja 95-odstotna meja zaupanja $IZ = \mu - 1,96 \sigma/\sqrt{N}$

Bland -Altmanov diagram razlik lahko prikaže naslednje odklone (32):

- (relativno) točnost s povprečjem razlik in odmik od tega,
- natančnost z razpršenostjo razlik in odmik od tega,
- trend,
- heteroskedastičnost.

Ustrezno ujemanje pomeni, da je dovolj velik delež razlik na Bland-Altmanovem diagramu dovolj majhen oz. dovolj blizu nuli (32). Zato moramo predhodno določiti praktično nepomembno razliko (δ_0) oz. praktično sprejemljivo mejo razlik med metodama (32). Sistematična napaka je vsak odmik povprečja razlik od nule (32). To napako je možno

računsko korigirati, če na diagramu ni drugih odklonov (32). Na oceno sprejemljivosti ujemanja zelo vpliva variabilnost napak (32). Če je ta velika, je to resna pomanjkljivost (32). Trend pomeni, da se povprečna napaka spreminja z velikostjo merjene vrednosti (32). Spreminjanje variabilnosti, ki se kaže kot porazdelitev točk na diagramu v obliki troblje, se imenuje heteroskedastičnost (32). V tem primeru se morajo podatki logaritemsko transformirati (32).

Ujemanje metod za vse 3 parametre smo vrednotili in prikazali po predhodno opisanem postopku: izračunali smo razlike dobljenih vrednosti, povprečja vseh parov meritev, relativno razliko, aritmetično sredino in standardni odklon vseh razlik (32). Potem smo izračunali 95-odstotni IZ za aritmetično sredino in 95-odstotni IU za spodnjo in zgornjo mejo (32). Za vsak parameter smo naredili 2 diagrama razlik: prvi diagram, ki prikazuje absolutne vrednosti ujemanja, in drugi diagram, ki prikazuje relativne vrednosti ujemanja. Diagram, ki prikazuje relativne vrednosti ujemanja, je bolj pregleden in uporaben v primerih, ko je prisoten trend, oz. ko se je povprečna napaka spreminjala z velikostjo merjene vrednosti (v primeru Lh in Pr1). Na osnovi izračunanih povprečji razlik smo ugotavljali prisotnost/odsotnost sistematične napake (32). V primeru, da je bila prisotna sistematična napaka (povprečja razlik so bila različna od vrednosti "0"), smo na osnovi izračuna 95 % IZ ocenili, ali je ta napaka značilna/velika ali neznačilna/majhna: statistična napaka pri stopnji tveganja 5 % ni bila značilna, kadar je 95 % IZ vključeval vrednost "0" (32). Na podlagi 95 % IU smo ugotovili prisotnost/odsotnost slučajne napake: večji, kot je bil interval, večja je bila napaka (32). Prisotnost trenda smo ocenili na podlagi regresijske premice (32). Iz diagramov smo sklepali tudi o heteroskedastičnosti: če so bile točke na diagramu v obliki "troblje", je to pomenilo spreminjanje variabilnosti oz. prisotnost heteroskedastičnosti.

3.6 Metoda Krouwerja in Montija: gorski diagram

Gorski diagram ali "diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve" je komplementaren Bland-Altmanovem diagramu in ima določene prednosti (32): neobčutljivost za skrajne vrednosti, lažje ugotavljanje osrednjih 95-odstotnih podatkov (tudi pri porazdelitvi, ki ni normalna), lažja ocena percentilov velikih razlik in lažja primerjava različnih porazdelitev (32). Prednost je tudi to, da lahko na istem diagramu prikažemo krivulje za več parov metod in tako ocenimo obnašanje dveh ali več novih metod v primerjavi z referenčno (32).

Gorske diagrame za vse 3 parametre smo naredili na naslednji način (32): izračunali smo razlike vseh parov meritev in te razlike rangirali, oz. jih razvrstili po velikosti. Rangiranim vrednostim smo dodelili centile (percentile; preglednica XII). Percentilne vrednosti smo dobili tako, da smo v programu MS Office Excel izračunali "utežena povprečja" (preglednica XII). Dobljene percentilne vrednosti smo "prepognili" tako, da smo vsem percentilom, ki so imeli vrednost večjo kot 50, dodelili vrednost 100-percentile (preglednica XII). Narisali smo diagram: na os absciso smo nanegli razlike parov vrednosti in na os ordinato izračunane "prepognjene" vrednosti. O razhajanju med metodama smo sklepali na osnovi vrha krivulje: če med metodama ni bilo sistematičnega razhajanja, je bil vrh krivulje nad vrednostjo "0", sicer je bil vrh nad mediano razliko (32). Mediana, ki smo je predhodno izračunali (preglednica XIII), je uporabna v primerih, ko je statistična spremenljivka porazdeljena nesimetrično (32). Izračunali smo tudi 5. In 95. percentil (preglednica XIII), na podlagi katerih smo ugotovili interval, znotraj katerega se nahaja 90 % razlik v meritvah med metodama (32).

Preglednica XII: Izračun kvantilov (centilov/percentilov) in prepognjenih percentilnih vrednosti

Izračun kvantilov (centilov/percentilov)
p (percentil) ima vrednost od 1–100; n je število enot
$n \times p/100$ ni celo število \rightarrow k je navzdol zaokrožen $n \times p/100$; vrednost kvantila p je $(k+1)$ -ta največja vrednost
$n \times p/100$ je celo število \rightarrow definiramo $m_1 = n \times p/100$ in $m_2 = n \times p/100 + 1$; vrednost kvantila p je povprečje med m_1 -to in m_2 -to največjo vrednostjo
Izračun centilov v MS Office Excelu
Uteženo povprečje pri $X_{(n-1)p+1}$. Vrednost centila p dobimo tako, da izračunamo uteženo povprečje vrednosti X_i in X_{i+1} , kjer je i celi del vrednosti $(n-1)p+1$. n je število enot p je velikost centila, deljeno s 100 X_i je vrednost spremenljivke X na i -tem mestu (spremenljivka je razvrščena po velikosti od najmanjše do največje).
"Prepognjene" percentilne vrednosti percentili $> 50 \rightarrow$ 100-percentile

Preglednica XIII: Izračun mediane in 5./95. percentila

a) Izračun mediane
Mediana pomeni tisto vrednost, od katere ima polovica enot manjše ali enake, polovica enot pa večje ali enake vrednosti spremenljivk.
1. Podatke razvrstimo po velikosti.
2. a) Če je n liho število: mediana enaka vrednosti srednje enote, oziroma: mediana je m -ta največja vrednost, pri čemer je $m = (n+1)/2$. b) Če je n sodo število: mediana je povprečje vrednosti srednjega para podatkov, oziroma: mediana je povprečje m_1 -te in m_2 -te največje vrednosti, pri čemer je $m_1 = n/2$ in $m_2 = n/2 + 1$.
b) Izračun 5./95. percentila
$5./95. \text{ percentil} = k + 1 \text{ mesto}$ $k = \text{percentil} \times n / 100$

Metodi Blanda in Altmana ter Krouwerja in Montija temeljijo na enostavnih izračunih in preglednih grafičnih prikazih. Ta pravilen statistični pristop nam je omogočil ustrezno vrednotenje ujemanja rezultatov naših metod.

4. REZULTATI

Prvi del rezultatov se nanaša na verifikacijo metode ECLIA oz. na vrednotenje rezultatov natančnosti in točnosti. Drugi del predstavljajo rezultati vrednotenja ujemanja z Bland-Altmanovo metodo in Krouwer-Montijevo metodo.

4.1 Rezultati verifikacije ECLIA metode

Rezultati vrednotenja natančnosti metode so prikazani v preglednici XIV. Po izvedenih testih ponovljivosti smo primerjali izračunan KV za vsak parameter s KV, ki ga je podal proizvajalec (preglednica X, preglednica XI). Na osnovi tega smo sklepali o natančnosti nove metode. Upoštevali smo tudi priporočen kriterij za KV 1–5 %. *Rezultati vrednotenja točnosti* metode so prikazani v preglednici XV. Po izvedenih meritvah parametrov iz kontrolnih vzorcev smo izračunali RE za povprečje rezultatov vsakega posameznega parametra. Kot ciljne vrednosti oz. ciljna povprečja smo izbrali vrednosti, ki jih je podal proizvajalec (preglednica XV). Poleg RE, na osnovi katerih smo sklepali o točnosti metode, smo kot kriterij zadovoljive točnosti upoštevali referenčne vrednosti kontrolnega materiala, ki jih je podal proizvajalec (preglednica XV).

Vrednotenje natančnosti ECLIA metode

Pri vseh treh parametrih smo izračunali KV: znotraj serij/znotraj dneva in celokupni/med dnevi/znotraj treh dni. Dobljene KV smo primerjali s KV, ki jih je podal proizvajalec. Pri tem smo upoštevali tisti KV proizvajalca, ki je podan za povprečne vrednosti rezultatov, ki so bile najbližje našim povprečnim vrednostim rezultatov. Poleg tega, smo upoštevali priporočljiv kriterij za KV 1–5 %. Prvi dan merjenja **Fsh** za povprečje rezultatov 30,67 IU/L smo dobili KV 1,80 %. Drugi dan merjenja za povprečje rezultatov 31,14, IU/L smo dobili KV 1,05 %. Tretji dan merjenja za za povprečje rezultatov 28,49 IU/L smo dobili KV 1,82 %. Proizvajalec je za povprečje rezultatov 28,9 IU/L podal vrednost KV 1,4 %. Iz tega lahko sklepamo, da so naši KV znotraj serij primerljivi s KV proizvajalca. Drugi dan smo dobili najnižji KV (tudi nižji od KV proizvajalca), tretji dan pa najvišji KV. Naši KV so znotraj priporočljivega kriterija za KV 1–5 %. Povprečje rezultatov izmerjenih v obdobju treh dni znaša 30,10 IU/L in KV 4,19 %. Proizvajalec je za povprečje rezultatov 28,9 IU/L podal vrednost KV (meddnevna/znotraj treh dni) 2,9 %. Iz tega lahko sklepamo, da je naš celokupni KV (4,19 %) nekoliko višji kot KV proizvajalca, ampak je primerljiv in se nahaja znotraj priporočljivega kriterija 1–5%. Vsi izračuni in podatki so prikazani v preglednici X in preglednici XIV. Prvi dan merjenja **Lh** za povprečje rezultatov 15,62 IU/L smo dobili KV 0,73 %. Drugi dan merjenja za povprečje rezultatov 15,59 IU/L smo dobili KV 1,11 %. Tretji dan merjenja za povprečje rezultatov 14,62 IU/L smo dobili KV 0,71 %. Proizvajalec je kot v primeru Fsh meril koncentracije Lh v vzorcih različnih konc. nivojev (preglednica X). Glede na to, da se povprečja rezultatov proizvajalca razlikujejo od naših povprečji rezultatov, nismo primerjali naše vrednosti KV z vrednostmi KV, ki jih je podal proizvajalec. Vsi dobljeni KV so nižji od 2 % in so znotraj priporočljivega kriterija. Najnižji KV smo dobili tretji dan merjenja, najvišji pa drugi dan merjenja. Povprečje rezultatov, izmerjenih v obdobju treh dni, znaša 15,27 IU/L in KV 3,24 %. Tudi celokupni KV (3,24 %) je znotraj priporočljivega kriterija, ampak ga iz že omenjenih razlogov nismo primerjali s celokupnim KV, ki ga je podal proizvajalec. Vsi izračuni in podatki so prikazani v preglednici X in preglednici XIV. Prvi dan merjenja **Pr1** za povprečje rezultatov 16,09 µg/L smo dobili KV 0,86 %. Drugi dan merjenja smo za povprečje rezultatov 15,67 µg/L dobili KV 1,51 %. Tretji dan merjenja smo za povprečje rezultatov 15,32 µg/L dobili KV 2,88 %. Proizvajalec je za povprečje rezultatov 14,1 µg/L podal vrednost KV 1,4 %. Iz tega lahko sklepamo, da so naši KV znotraj serij primerljivi s KV proizvajalca. Najvišji KV smo dobili tretji dan meritve, najnižji pa prvi dan (nižji od KV

proizvajalca). Vsi KV so znotraj priporočljivega kriterija. Povprečje rezultatov, ki smo ga dobili merjenjem znotraj treh dni, znaša 15,69 µg/L, KV znaša 2,67 % in je primerljiv s KV proizvajalca (5,0 %). Nahaja se tudi znotraj priporočljivega kriterija. Vsi izračuni in podatki so prikazani v preglednici XI in preglednici XIV.

Preglednica XIV: Rezultati vrednotenja natančnosti metode ECLIA

Dnevi	Št. meritev	Fsh (IU/L)	Lh (IU/L)	Prl (µg/L)
1. dan	1.	31,17	15,68	16,01
	2.	30,37	15,49	15,93
	3.	31,43	15,48	16,01
	4.	30,15	15,67	16,08
	5.	30,79	15,77	16,26
	6.	30,10	15,63	16,26
Povprečje		30,67	15,62	16,09
SD		0,55	0,11	0,14
KV		1,80	0,73	0,86
2. dan	1.	31,55	15,63	15,71
	2.	31,02	15,73	15,63
	3.	31,48	15,79	15,66
	4.	30,87	15,30	15,42
	5.	31,19	15,54	16,09
	6.	30,74	15,53	15,48
Povprečje		31,14	15,59	15,67
SD		0,33	0,17	0,24
KV		1,05	1,11	1,51
3. dan	1.	28,57	14,75	15,54
	2.	28,42	14,53	15,50
	3.	29,05	14,62	15,53
	4.	28,65	14,54	15,35
	5.	27,64	14,73	14,51
	6.	28,63	14,53	15,46
Povprečje		28,49	14,62	15,32
SD		0,52	0,10	0,44
KV (%)		1,82	0,71	2,88
Celokupno povprečje (3 dneh)		30,10	15,27	15,69
SD		1,26	0,49	0,42
KV (%)		4,19	3,24	2,67

Vrednotenje točnosti ECLIA metode

Za vrednotenje točnosti smo za vse tri parametre izračunali relativne napake (RE %). RE nam kažejo, za koliko % se naša dobljena povprečja rezultatov (za PC U1 in PC U2) razlikujejo od povprečja rezultatov, ki jih je podal proizvajalec. Poleg tega smo ugotavljali, ali so naše meritve znotraj referenčnih območij, ki jih je podal proizvajalec. Pri **Fsh** znaša povprečje rezultatov za PC U1 20,32 IU/L in je znotraj referenčnega območja, ki ga je podal proizvajalec. Iz RE (9,25 %) lahko sklepamo, da je naše povprečje rezultatov za 9,25 % višje od povprečja rezultatov proizvajalca. Povprečje rezultatov za PC U2 znaša 58,53 IU/L in se tudi nahaja znotraj referenčnega območja. Iz RE (3,60 %) lahko sklepamo, da je naše povprečje rezultatov za 11,1 % višje od povprečja rezultatov proizvajalca. Vse izmerjene vrednosti Fsh (za PC U1 in PC U2) se nahajajo znotraj referenčnih območij. Pri **Lh** povprečje rezultatov za PCU1 znaša 11,80 IU/L in je znotraj referenčnega območja, ki ga je podal proizvajalec. Iz RE (12,38 %) lahko sklepamo, da je naše povprečje rezultatov za 12,38 % višje od povprečja rezultatov, ki ga je podal proizvajalec. Povprečje rezultatov za PC U2 znaša 55,69 IU/L in je tudi znotraj referenčnega območja. Iz RE (6,89 %) lahko sklepamo, da je naše povprečje rezultatov za 6,89 % višje od povprečja rezultatov proizvajalca. Tudi v primeru Lh so vsi rezultati meritev (za PC U1 in PC U2) znotraj referenčnih območij. Pri **Prl** povprečje rezultatov za PC U1 znaša 13,15 µg/L in je znotraj referenčnega območja, ki ga je podal proizvajalec. Iz RE (16,58 %) lahko sklepamo, da je naše povprečje rezultatov za 16,58 % višje od povprečja rezultatov, ki ga je podal proizvajalec. Povprečje rezultatov za PC U2 znaša 45,35 µg/L in je tudi znotraj referenčnega območja. Iz RE (10,91 %) lahko sklepamo, da je naše povprečje rezultatov za 10,91 % višje od povprečja rezultatov proizvajalca. Vsi rezultati meritev (za PC U1 in PC U2) se nahajajo znotraj referenčnih območij. Rezultati naših meritev in meritev proizvajalca (povprečne in referenčne vrednosti) so prikazane v preglednici XV.

Preglednica XV: Rezultati vrednotenja točnosti metode ECLIA

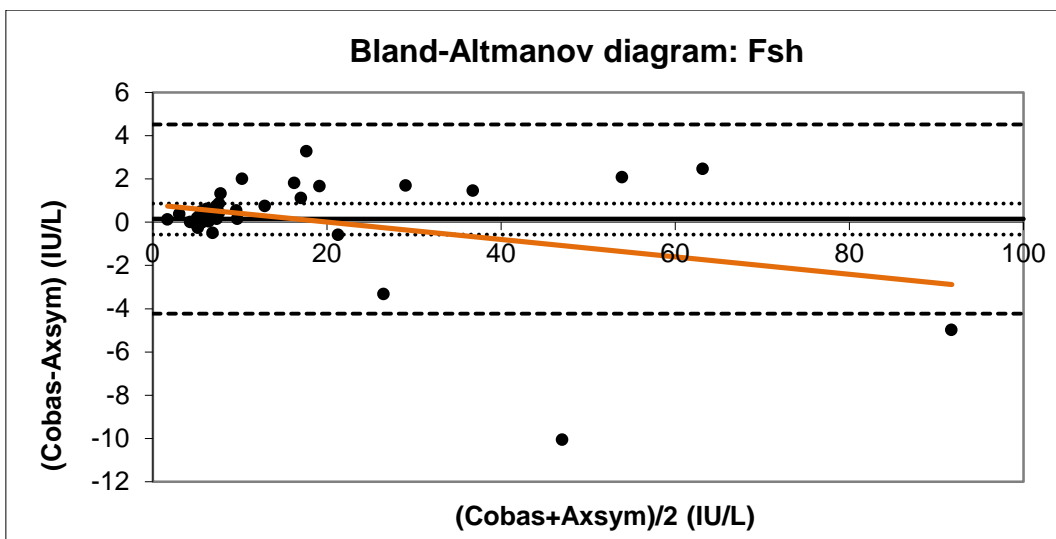
Meritev	Parameter					
	Fsh (IU/L)		Lh (IU/L)		Prl (µg/L)	
N (štev.meritev) = 20	PC U1	PC U2	PC U1	PC U2	PC U1	PC U2
PC U1: Preci Control Universal 1 (nizek nivo) PC U2: Preci Control Universal 2 (visok nivo)						
Referenčne vrednosti proizvajalca	13,02-24,18	36,89-68,51	8,30-12,71	41,16-63,04	8,91-13,65	32,30-49,48
Povprečne vrednosti proizvajalca	18,6	52,7	10,5	52,1	11,28	40,89
1.	21,98	55,64	11,94	55,31	12,77	44,59
2.	22,51	63,09	12,56	60,32	13,47	47,26
3.	22,96	58,19	12,23	53,05	12,87	42,34
4.	21,69	58,27	10,43	58,06	12,95	45,47
5.	21,79	56,19	11,95	56,49	12,9	41,47
6.	20,17	57,86	11,72	57,32	11,96	45,48
7.	19,10	58,30	12,01	57,65	13,45	44,74
8.	21,79	56,97	11,47	55,44	13,59	46,09
9.	22,00	57,76	12,47	55,44	12,66	43,45
10.	22,20	58,40	11,63	61,25	13,86	45,03
11.	20,57	64,13	12,04	58,72	12,60	47,54
12.	20,06	59,51	12,44	53,56	13,64	47,39
13.	21,81	57,93	11,57	50,96	13,67	46,74
14.	18,61	57,91	11,34	54,14	13,31	47,54
15.	16,20	59,24	12,23	52,82	13,30	49,16
16.	18,33	57,83	12,19	61,66	13,45	49,15
17.	18,65	58,27	11,24	58,02	13,75	46,54
18.	18,25	59,61	11,65	49,15	13,91	39,61
19.	18,66	60,17	11,47	53,70	12,90	43,44
20.	18,97	56,38	11,49	54,38	11,98	43,98
Povprečje	20,32	58,53	11,80	55,69	13,15	45,35

SD	1,87	2,11	0,51	3,31	0,57	2,49
KV (%)	9,21	3,60	4,31	5,94	4,34	5,48
RE (%)	9,25	11,1	12,38	6,89	16,58	10,91

4.2 Vrednotenje ujemanja rezultatov z Bland-Altman metodo

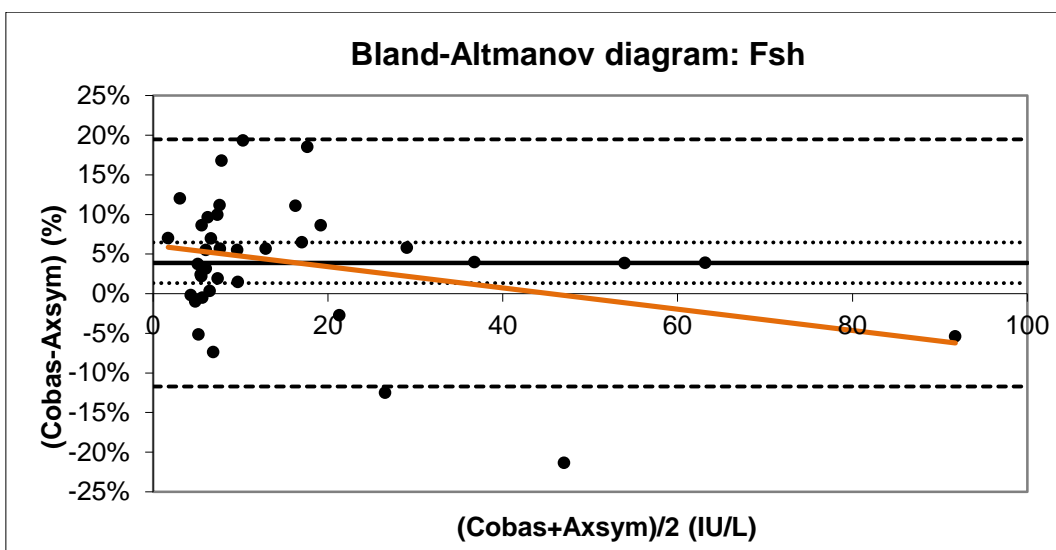
V različnem številu vzorcev (N) smo izmerili vrednosti Fsh (N=37), Lh (N=41) in Prl (N=45) na obeh analizatorjih. Za vsak parameter smo izračunali: razlike dobljenih vrednosti (**cobas – axsym**), povprečja vseh parov meritev ($((\mathbf{cobas-axsym}/2))$), relativno razliko ($(\mathbf{cobas-axsym}/(\mathbf{cobas+axsym}/2))$), povprečja razlik in standardni odklon vseh razlik. Rezultati meritev in izračuni so prikazani v prilogah 1, 2 in 3. Za vsak parameter smo izračunali 95 % IZ za aritmetično sredino in 95 % IU za spodnjo in zgornjo mejo intervala (priloge 1, 2 3). Podatke, ki jih potrebujemo za vrednotenje ujemanja obeh metod, smo prikazali grafično (slike 6, 8 in 10). Naredili smo tudi diagrame, ki prikazujejo relativne vrednosti ujemanja (slike 7, 9 in 11).

V primeru Fsh iz povprečja razlik (polna sredinska črta na sliki 6; 0,15 IU/L) lahko sklepamo, da je prisotna sistematična napaka, oz. da analizator Cobas e 411 v povprečju daje za 0,15 IU/L višje rezultate kot analizator Axsym. Sistematična napaka pri stopnji tveganja 5 % ni značilna, saj 95 % IZ vključuje vrednost "0" (pikčasti črti na sliki 6). Meji ujemanja nam povesta, da se 95 % razlik v rezultatih nahaja znotraj tega intervala: npr. če naredimo 100 analiz Fsh, lahko pričakujemo, da bo pri 95 analizah razlika v rezultatih med analizatorji znotraj [-4,23, 4,52 IU/L]. Poleg sistematične napake je iz prikaza po Bland-Altmanu razvidna tudi slučajna napaka. To ocenimo s pomočjo 95 % IU (široko črtkani črti na sliki 6). Iz diagrama je tudi razvidno, da se povprečna napaka spreminja z velikostjo merjene vrednosti. Ta odnos prikazuje regresijska premica (polna oranžna črta na sliki 6). Heteroskedastičnosti v tem primeru ni.



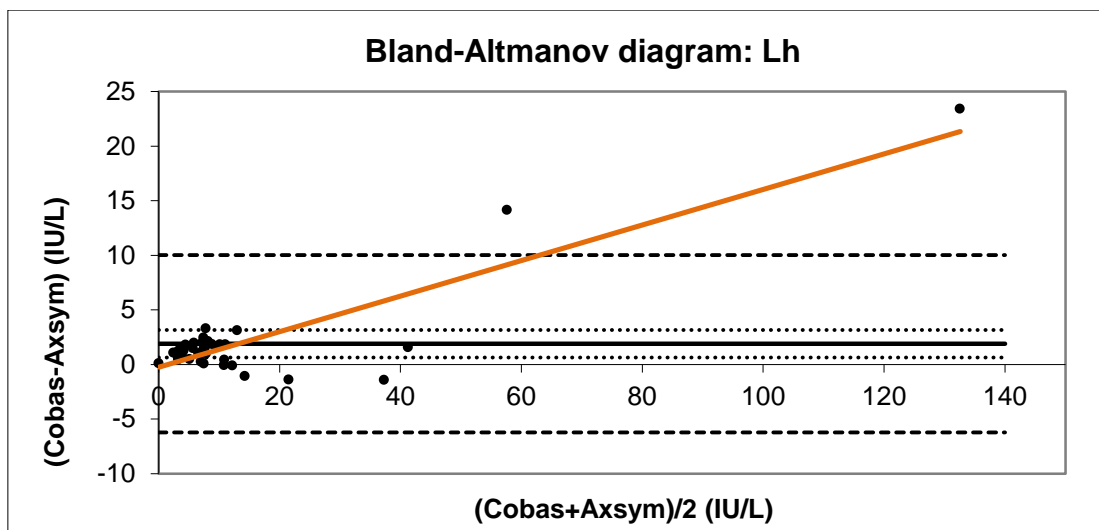
Slika 6: Fsh diagram razlik

Legenda: $(Cobas-Axsym)$ – razlike parov meritev Fsh, izmerjenih na analizatorju Cobas e411 in analizatorju Axsym, $(Cobas+Axsym)/2$ – povprečja parov meritev Fsh, izmerjenih na analizatorju Cobas e411 in analizatorju Axsym, **polna sredinska črta** – povprečje razlik, **pikčasti črti** – meji 95 % IZ za povp.razlik, **široko črtkani črti** – meji 95 % IU, **polna oranžna črta** – regresijska premica.



Slika 7: Fsh diagram razlik (%)

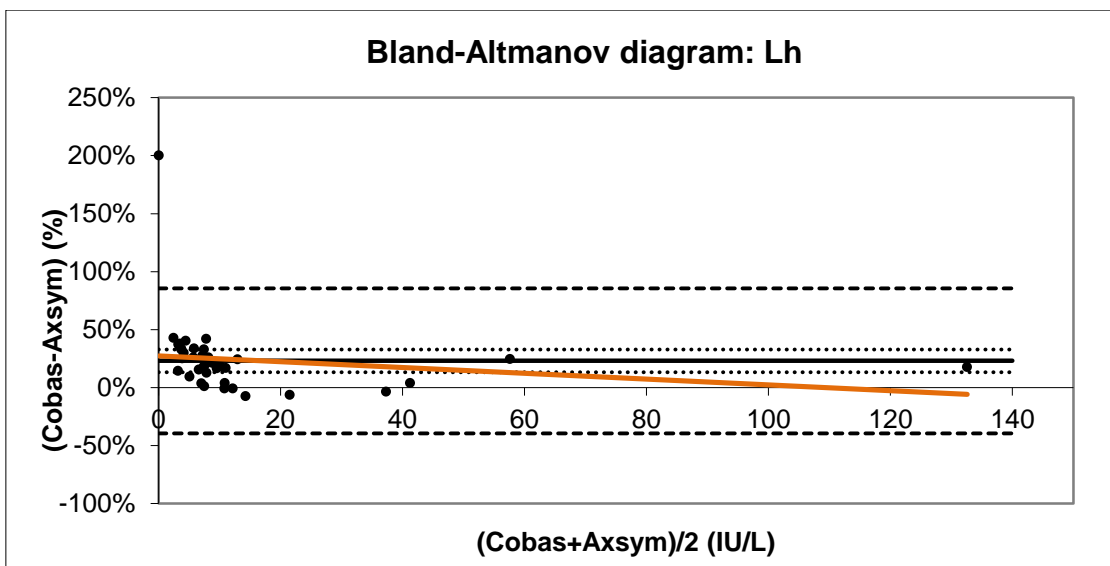
Legenda: $(Cobas-Axsym)$ – relativne razlike parov meritev Fsh, izmerjenih na analizatorju Cobas e411 in analizatorju Axsym, $(Cobas+Axsym)/2$ – povprečja parov meritev Fsh, izmerjenih na analizatorju Cobas e411 in analizatorju Axsym, **polna sredinska črta** – povprečje razlik, **pikčasti črti** – meji 95 % IZ za povp.razlik, **široko črtkani črti** – meji 95 % IU, **polna oranžna črta** – regresijska premica.



Slika 8: Lh diagram razlik

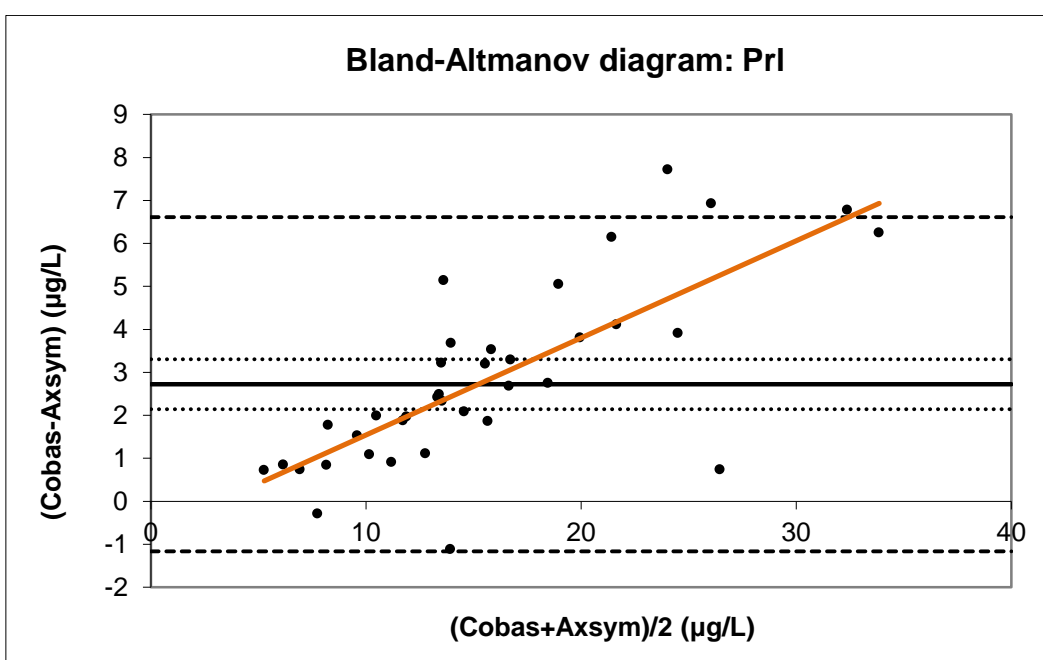
Legenda: $(\text{Cobas}-\text{Axsym})$ – razlike parov meritev Lh, izmerjenih na analizatorju Cobas e411 in analizatorju Axsym, $(\text{Cobas}+\text{Axsym})/2$ – povprečja parov meritev Lh, izmerjenih na analizatorju Cobas e411 in analizatorju Axsym, **polna sredinska črta** – povprečje razlik, **pikčasti črti** – meji 95 % IZ za povp.razlik, **široko črtkani črti** – meji 95 % IU, **polna oranžna črta** – regresijska premica.

V primeru Lh iz povprečja razlik (polna sredinska črta na sliki 9; 23,1 %) lahko sklepamo, da je prisotna sistematična napaka, oz. da analizator Cobas e 411 v povprečju daje za 23,1 % višje rezultate kot analizator Axsym. Sistematična napaka pri stopnji tveganja 5 % je značilna, saj 95 % IZ ne vključuje vrednosti "0" (pikčasti črti na sliki 9). Meji ujemanja nam povesta, da se 95 % razlik v rezultatih nahaja znotraj tega intervala: npr. če naredimo 100 analiz Lh, lahko pričakujemo, da bo pri 95 analizah relativna razlika v rezultatih med analizatorji znotraj [-39,0; 86,0 %]. Poleg sistematične napake je iz prikaza po Bland-Altmanu razvidna tudi slučajna napaka. To ocenimo s pomočjo 95 % IU (široko črtkani črti na sliki 9). Iz diagrama je tudi razvidno, da se povprečna napaka spreminja z velikostjo merjene vrednosti. Ta odnos prikazuje regresijska premica (polna oranžna črta na sliki 9). Heteroskedastičnosti v tem primeru ni.



Slika 9: Lh diagram razlik (%)

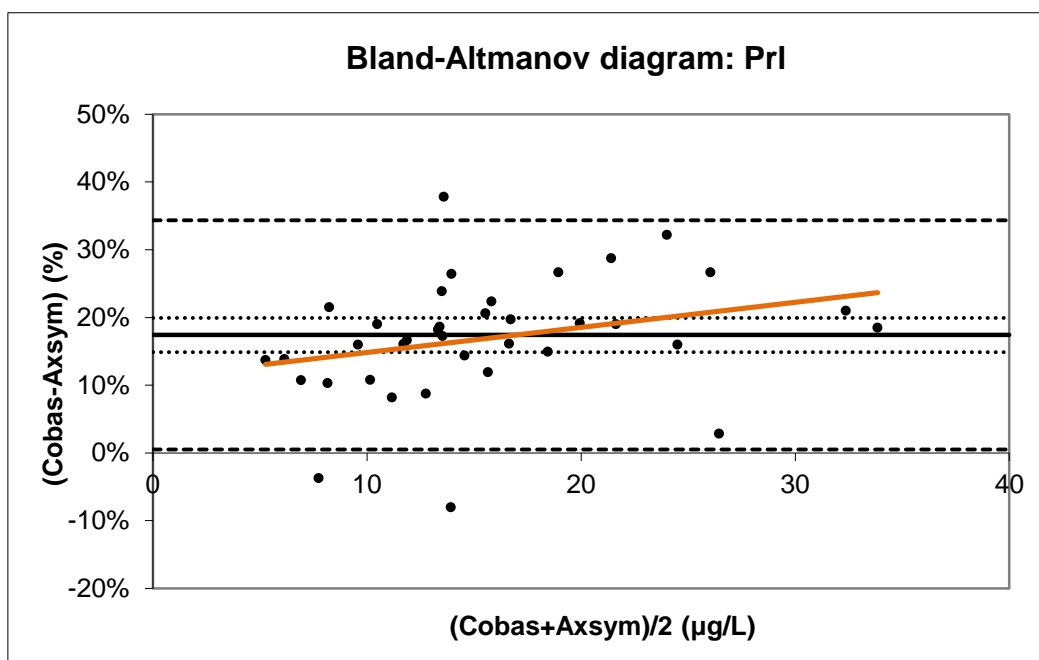
Legenda: $(\text{Cobas}-\text{AxSYM})$ – relativne razlike parov meritev Lh, izmerjenih na analizatorju Cobas e411 in analizatorju AxSYM, $(\text{Cobas}+\text{AxSYM})/2$ – povprečja parov meritev Lh, izmerjenih na analizatorju Cobas e411 in analizatorju AxSYM, **polna sredinska črta** – povprečje razlik, **pikčasti črti** – meji 95 % IZ za povp.razlik, **široko črtkani črti** – meji 95 % IU, **polna oranžna črta** – regresijska premica.



Slika 10: Prl diagram razlik

Legenda: $(\text{Cobas}-\text{AxSYM})$ – razlike parov meritev Prl, izmerjenih na analizatorju Cobas e411 in analizatorju AxSYM, $(\text{Cobas}+\text{AxSYM})/2$ - povprečja parov meritev Prl, izmerjenih na analizatorju Cobas e411 in analizatorju AxSYM, **polna sredinska črta** – povprečje razlik, **pikčasti črti** – meji 95 % IZ za povp.razlik, **široko črtkani črti** - meji 95 % IU, **polna oranžna črta** – regresijska premica.

V primeru Prl lahko iz povprečja razlik (polna sredinska črta na sliki 11; 17,4 %) sklepamo, da je prisotna sistematična napaka, oz. da analizator Cobas e 411 v povprečju daje za 17,4 % višje rezultate kot analizator Axsym. Sistematična napaka pri stopnji tveganja 5 % je značilna, saj 95 % IZ ne vključuje vrednosti "0" (pikčasti črti na sliki 11). Meji ujemanja nam povesta, da se 95 % razlik v rezultatih med analizatorji nahaja znotraj tega intervala: npr. če naredimo 100 analiz Prl, lahko pričakujemo, da bo pri 95 analiz relativna razlika v rezultatih med analizatorji znotraj [1,0; 34,0 %]. Poleg sistematične napake je iz prikaza po Bland-Altmanu razvidna tudi slučajna napaka. To ocenimo s pomočjo 95 % IU (široko črtkani črti na sliki 11). Iz diagrama je tudi razvidno, da se povprečna napaka spreminja z velikostjo merjene vrednosti. Ta odnos prikazuje regresijska premica (polna oranžna črta na sliki 11). Heteroskedastičnosti v tem primeru ni.



Slika 11: Prl diagram razlik (%)

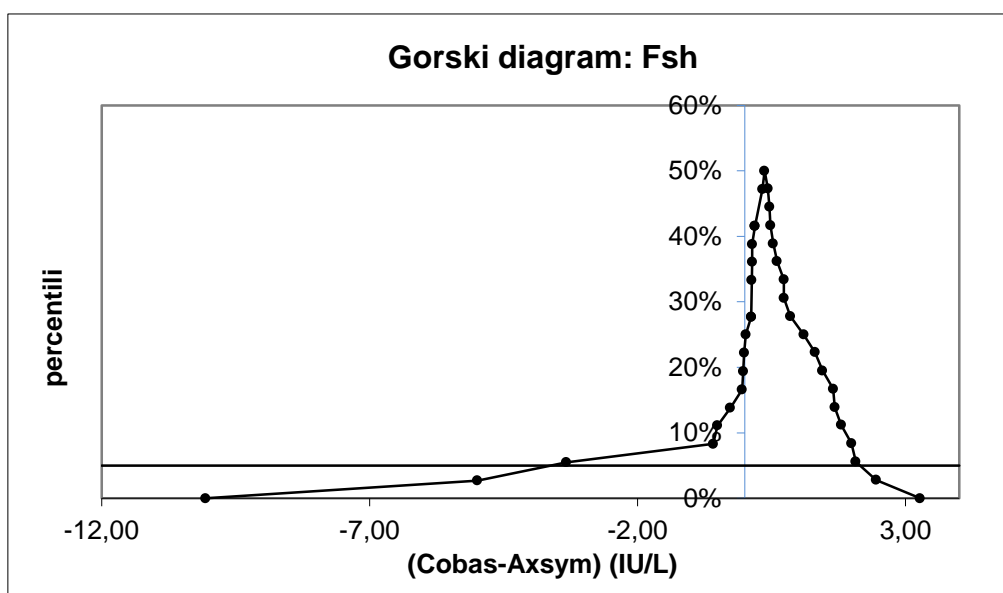
Legenda: $(\text{Cobas}-\text{Axsym})$ – relativne razlike parov meritev Prl, izmerjenih na analizatorju Cobas e411 in analizatorju Axsym, $(\text{Cobas}+\text{Axsym})/2$ – povprečja parov meritev Prl, izmerjenih na analizatorju Cobas e411 in analizatorju Axsym, **polna sredinska črta** – povprečje razlik, **pikčasti črti** – meji 95 % IZ za povp. razlik, **široko črtkani črti** – meji 95 % IU, **polna oranžna črta** – regresijska premica.

4.3 Vrednotenje ujemanja rezultatov s Krouwer-Montijevo metodo

Z namenom, da prikažemo porazdelitev razlik med metodama, smo naredili še en grafični prikaz za vsak parameter, in sicer diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve (gorski diagram). Izmerili smo vrednosti Fsh, Lh in Prl na obeh analizatorjih

in za vsak parameter izračunali razlike vseh parov meritev (**Cobas-Axsym**). Razlike smo razvrstili po velikosti (rangirali) in rangiranim vrednostim dodelili centile (**percentile**). Dobljene percentilne vrednosti smo »prepognili« (**prepognjeni percentili**). Rezultati meritev in izračuni so prikazani v prilogah 4, 5 in 6. Podatke, ki jih potrebujemo za vrednotenje ujemanja obeh metod, smo prikazali grafično (slike 12, 13 in 14). Na os absciso smo nanegli razlike parov meritev (**Cobas-Axsym**), na os ordinato pa prepognjene percentile (**percentili**).

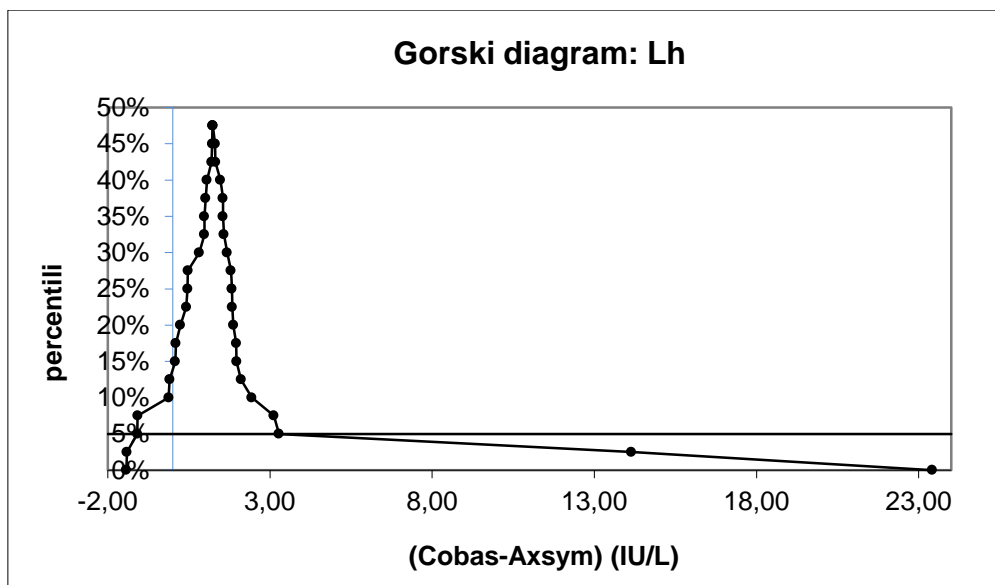
V primeru Fsh lahko sklepamo, da analizator Cobas e 411 daje za 0,37 IU/L višje rezultate kot analizator Axsym, oz. da je prisotna sistematična napaka. To smo ocenili na podlagi mediane razlike rezultatov, ki je prikazana na sliki 12 (vrh krivulje). Iz izračuna 5. in 95. percentila lahko zaključimo, da se 90 % razlik v rezultatih med analizatorji nahaja znotraj [-3,66; 2,15 IU/L] intervala (slika 12).



Slika 12: Fsh gorski diagram

Legenda: (**Cobas-Axsym**) – razlike parov meritev Fsh; **percentili** – prepognjene percentilne vrednosti (percentili >50→100-percentile); **modra navpična črta** – razlika "0"; **vrh krivulje/gore** (ni nad vrednostmi razlike "0" – prisotna je sistematična napaka) – mediana razlike (IU/L); **vodoravna polna črta** – 5. in 95. percentil.

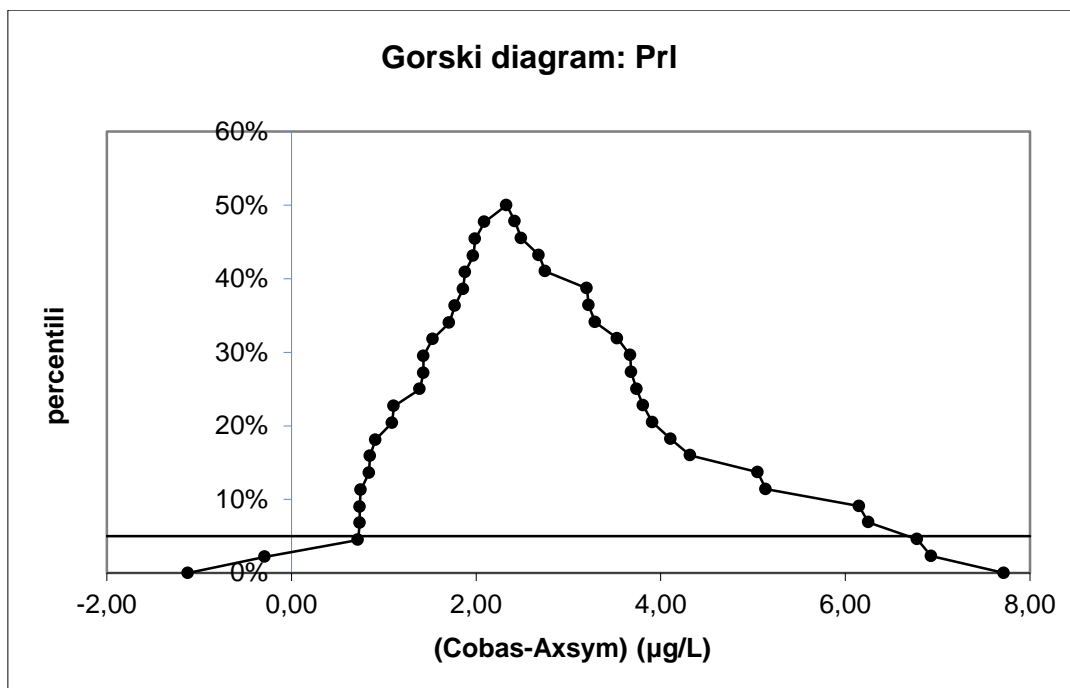
Tudi v primeru Lh je prisotna sistematična napaka, saj smo ugotovili, da analizator Cobas e 411 daje za 1,23 IU/L višje rezultate kot analizator Axsym (slika 13). 90 % razlik v rezultatih med analizatorji se nahaja znotraj [-1,09; 3,28 IU/L] intervala (slika 13).



Slika 13: Lh gorski diagram

Legenda: **(Cobas-Axsym)** – razlike parov meritev Lh; **percentili** – prepognjene percentilne vrednosti (percentili >50→100-percentile); **modra navpična črta** – razlika "0"; **vrh krivulje/gore** (ni nad vrednostmi razlike "0" – prisotna je sistematična napaka) – mediana razlike (IU/L); **vodoravna polna črta** – 5. in 95. percentil.

Pri Pri smo ugotovili, da analizator Cobas e 411 daje za 2,33 $\mu\text{g/L}$ višje rezultate kot analizator Axsym (prisotna sistematična napaka; slika 14) in da se 90 % razlik v rezultatih med analizatorji nahaja znotraj [0,724; 6,674 $\mu\text{g/L}$] intervala (slika 14).



Slika 14: Prl gorski diagram

Legenda: (Cobas-Axsym) – razlike parov meritev Prl; **percentili** – prepognjene percentilne vrednosti (percentili >50→100-percentile); **modra navpična črta** - razlika "0"; **vrh krivulje/gore** (ni nad vrednostmi razlike "0" – prisotna je sistematična napaka) – mediana razlike (µg/L); **vodoravna polna črta** – 5. In 95. percentil.

5. RAZPRAVA

V medicinskih laboratorijih imamo za cilj zagotoviti kakovostne rezultate. Takšni rezultati, ki pomenijo "pravilne rezultate ob pravem času", omogočajo tudi kakovostno in uspešno nadaljnjo obravnavo preiskovanca. Da bi to dosegli, moramo podrobno poznati vsak korak analiznega postopka, t. j. predanalitično, analitično in postanalitično fazo (35). Preanalitična faza zajema: izbiro parametrov, ki jih bomo analizirali pri posameznem preiskovancu (s strani zdravnika), odvzem vzorca, transport vzorca, sprejem, vpis in triaža vzorcev na sprejemu biološkega materiala (35). Analitična faza pomeni pripravo in analizo vzorca ter validacijo rezultatov (35). Postanalitična faza se nanaša na kontroliranje in pošiljanje izvidov k naročniku, arhiviranje vzorcev in izvidov ter sporočanje izvidov naročniku (po potrebi (35)). Poleg omenjenih korakov analiznega postopka moramo poznati in izbrati ustrezne analizne metode in merilne instrumente. Za katero metodo se bomo odločili, je odvisno od več dejavnikov. Želimo si metodo, ki bi imela boljšo točnost in natančnost (ponovljivost), širše linearno območje in manj možnosti vpliva motečih snovi (35). Poleg tega je pomembno, da je poraba reagentov in ostalih raztopin čim manjša, da zahteva manjši volumen vzorca, manj predpriprav vzorca, reagentov in ostalih raztopin ter da rezultate dobimo v najkrajšem možnem času (35). Takšna metoda je zaželjena, saj omogoča kakovostne in hitre rezultate ter bistveno znižuje laboratorijske stroške.

Poleg uvedb novih metod obstajajo tudi potrebe za uvedbo novih analizatorjev, ki so preprostejši za uporabo, cenovno ugodnejši, hitrejši ali kako drugače primernejši (35). Tudi ta postopek mora biti jasno opredeljen in sledljiv (35). V laboratoriju ZD Postojna smo se odločili zamenjati zastareli imunokemični analizator Axsym proizvajalca Abbott z analizatorjem Cobas e 411 proizvajalca Roche. Zaradi tega je bilo potrebno ugotoviti, ali sta merilna instrumenta med seboj izmenljiva in kako dobro se ujemajo rezultati, ki smo jih z njima izmerili. Korelacija, ki se najpogosteje izraža s Pearsonovim korelacijskim koeficientom, omogoča vpogled v razmerje med skupno variabilnostjo rezultatov obeh metod in variabilnostjo rezultatov vsake metode posebej (primerja obe skupini rezultatov v celoti, ne parov meritev), ne zajema pa točnosti (32). Ne zajema niti natančnosti, ki se izraža kot variabilnost razlik parov (32). Točnost in natančnost sta ključna pojma v pravilnem ocenjevanju ujemanja (32). Korelacija zato ni primerna metoda za ocenjevanje ujemanja in je nismo izbrali kot "statistično orodje" za primerjanje naših rezultatov. Tudi linearna regresija ni metoda, ki je priporočljiva za ocenjevanje ujemanja rezultatov dveh metod. Ta metoda namreč omogoča napovedovanje vrednosti ene spremenljivke na

podlagi druge, ne zajema pa točnosti in natančnosti (32). Iz vrednosti naklona in presečišča lahko sicer ocenimo povprečno ujemanje za skupino, ne moremo pa oceniti ujemanja za posamezne pare meritev (32). Poleg tega ne upošteva, da imata pri ocenjevanju ujemanja napako obe spremenljivki (32). Zaradi tega nismo izbrali linearne regresije kot statistične metode za primerjanje in vrednotenje naših rezultatov.

Da bi bila ocena ujemanja realna in uporabna, mora zajeti enega od naslednjih parov: točnost in natančnost, pričakovana vrednost in variabilnost (slučajna in sistematična napaka meritev) (32). Takšno oceno ujemanja omogočata dve metodi, ki sta se do sedaj uveljavili kot standard: metoda Blanda in Altmana in metoda Krouwerja in Montija (32). Metodi na podlagi enostavnih statističnih izračunov in nazornih grafičnih prikazov omogočata enostaven in relevanten vpogled v točnost in natančnost metod ter v njihovo ujemanje. Iz teh razlogov smo se odločili preizkusiti omenjeni statistični metodi pri zamenjavi imunoloških analizatorjev. Preden smo pristopili k postopku ocenjevanja ujemanja MEIA (Axsym) in ECLIA (cobas e 411) metod, je bilo potrebno novo ECLIA metodo verificirati. To smo naredili tako, da smo ocenili njeno točnost in natančnost.

Za ocenjevanje ujemanja rezultatov, ki smo jih dobili pri merjenju na obeh analizatorjih, smo izbrali parametre Fsh, Lh in Prl. Omenjene hormone naročajo zdravniki iz ginekoloških ambulant našega ZD v namen diagnosticiranja in spremljanja zdravljenja raznovrstnih motenj ženskega spolnega cikla. Motnje, kot so sindrom policističnih jajčnikov, amenoreje, polimenoreje, oligomenoreje, vmesne krvavitve in številne druge, so zelo pogoste v sodobnem času in so najpogosteje posledica neuravnovešenosti neuroendokrinega sistema (6, 12). Na delovanje tako prepletenega sistema vplivajo številni okoljski stresorji, ki se jim pogosto ne moremo izogniti, motnje pa vplivajo na kakovost življenja in imajo včasih lahko zelo resne posledice (12). V tem primeru je zato zelo pomembna večstopenjska diagnostika (12). Z namenom, da preizkušamo statistični metodi Bland-Altmana ter Krouwer-Montija in ugotovimo, kakšno je ujemanje med rezultati, ki smo jih izmerili na analizatorju Axsym in analizatorju Cobas e411, smo zbrali serumske vzorce ginekoloških pacientk ZD, in sicer: 37 vzorcev za merjenje Fsh, 41 vzorcev za merjenje Lh in 45 vzorcev za merjenje vrednosti Prl. Predhodno pripravljene vzorce smo analizirali sočasno na obeh imunoloških analizatorjih, rezultate smo vnesli v preglednico programa MS Office Excel in jih ustrezno statistično obdelali. V nadaljevanju sledi opis in tolmačenje rezultatov, ki smo jih dobili pri določanju natančnosti in točnosti nove ECLIA metode, ter tolmačenje rezultatov/ocene ujemanja obeh metod.

Natančnost in točnost ECLIA metode

Natančnost merjenja Fsh znotraj dneva/serije je zadovoljiva: vse tri dni merjenja je KV pod 2 % in je primerljiv s KV, ki ga je podal proizvajalec (1,4 %). Poleg tega so vsi dobljeni KV znotraj priporočljivega kriterija za KV 1–5 %. *Natančnost merjenja Fsh znotraj treh dni (meddnevna/celokupna natančnost)* je tudi zadovoljiva: naš celokupni KV (4,19 %) je sicer za nekoliko višji kot KV, ki ga je podal proizvajalec (2,9 %), ampak je še zmeraj znotraj priporočljivega kriterija za KV 1–5 %. *Natančnost merjenja Lh znotraj dneva/serije* je zadovoljiva: vse tri dni merjenja je KV pod 2 %. To pomeni, da je znotraj kriterija 1–5% in je rezultat sprejemljiv. Glede na to, da se povprečja rezultatov proizvajalca razlikujejo od naših povprečij rezultatov, nismo primerjali naše vrednosti KV z vrednostmi KV, ki jih je podal proizvajalec. *Natančnost merjenja Lh znotraj treh dni (meddnevna/celokupna natančnost)* je tudi v primeru Lh zadovoljiva: celokupni KV znaša 3,24 % in je znotraj priporočljivega kriterija. Iz že omenjenih razlogov ga nismo primerjali s celokupnim KV, ki ga je podal proizvajalec. *Natančnost merjenja Prl znotraj dneva/serije* je zadovoljiva: vse tri dni merjenja je KV pod 3 % in je primerljiv s KV, ki ga je podal proizvajalec (1,4 %). Vsi KV so znotraj priporočljivega kriterija. *Natančnost merjenja Prl znotraj treh dni (meddnevna/celokupna natančnost)* je zelo dobra: celokupni KV (2,67 %) je celo nekoliko nižji kot KV, ki ga je podal proizvajalec (5,0 %). Na osnovi dobljenih rezultatov natančnosti meritev posameznega parametra lahko zaključimo, da je bila meritev Prl najbolj natančna (KV 2,67 %) in meritev Fsh najmanj natančna (KV 4,19 %). Če bi za sprejemljivo natančnost merjenja omenjenih hormonov postavili kriterij za KV 1–5%, so meritve vseh treh parametrov zadovoljile natančnosti. Po primerjavi dobljenih KV vrednosti s KV vrednostmi, ki jih je podal proizvajalec, smo ugotovili, da je naša KV vrednost za Fsh nekoliko višja in naša KV za Prl nekoliko nižja kot KV proizvajalca. KV vrednost za Lh nismo primerjali s KV proizvajalca, ker se je naše povprečje rezultatov merjenja zelo razlikovalo od povprečij rezultatov merjenja proizvajalca. Rezultati natančnosti ECLIA metode so sprejemljivi pri vseh treh parametrih. Mogoče bi ocena natančnosti bila boljša, če bi jo določali na več različnih koncentracijskih nivojih, na različnih vzorcih in dlje časa. Vsak parameter smo namreč merili 3 dni zaporedoma, opravili 6 meritev dnevno, proizvajalec pa je meril 10 dni po 6 meritev dnevno. V tem primeru bi morali uporabiti vzorce ali vzorec, v katerem so omenjeni hormoni/parametri dlje časa stabilni. Lahko bi uporabili vzorce zunanje kontrole kakovosti z že izmerjenimi/podanimi vrednostmi. Primerjava bi bila mogoče v tem primeru boljša.

Točnost merjenja Fsh za PC U1 je zadovoljiva: povprečje rezultatov naših meritev (20,32 IU/L) je za 9,25 % (RE) višje od povprečja rezultatov, ki ga navaja proizvajalec (18,6 IU/L). Če kot kriterij sprejemljive točnosti postavimo referenčne vrednosti, ki jih je podal proizvajalec (13,02–24,18 IU/L), lahko zaključimo, da se povprečje rezultatov naših merenj nahaja znotraj tega območja in je sprejemljivo. **Točnost merjenja Fsh** za PC U2 je tudi zadovoljiva: povprečje rezultatov naših meritev (58,53 IU/L) je za 11,1 % (RE) višje od povprečja rezultatov, ki ga navaja proizvajalec (52,7 IU/L) in je znotraj referenčnega območja proizvajalca (36,89–68,51 IU/L). **Točnost merjenja Lh** za PC U1 je zadovoljiva: povprečje rezultatov naših meritev (11,80 IU/L) je za 12,38 % (RE) višje od povprečja rezultatov, ki ga navaja proizvajalec (10,5 IU/L). Če kot kriterij sprejemljive točnosti postavimo referenčne vrednosti, ki jih je podal proizvajalec (8,30–12,71 IU/L), lahko zaključimo, da se dobljeno povprečje rezultatov merjenja nahaja znotraj tega območja in je sprejemljivo. Zadovoljiva je tudi **točnost merjenja Lh** za PC U2, ker se povprečje rezultatov naših meritev (55,69 IU/L), ki je za 6,89 % višje od povprečja rezultatov proizvajalca (52,1 IU/L), nahaja znotraj referenčnega območja proizvajalca (41,16–63,04 IU/L). Povprečje rezultatov merjenja **točnosti Prl za PC U1** (13,15 µg/L) je za 16,58 % višje od povprečja rezultatov, ki ga navaja proizvajalec (11,28 µg/L), ampak je znotraj referenčnega območja proizvajalca (8,91–13,65 µg/L) in zato lahko sklepamo, da je točnost merjenja sprejemljiva. **Točnost merjenja Prl** za PC U2 je tudi zadovoljiva, ker je povprečje rezultatov naših meritev (45,35 µg/L) znotraj referenčnega območja proizvajalca (32,30–49,48 µg/L). Od povprečja rezultatov proizvajalca (40,89 µg/L) je višje za 10,91 % . Vrednosti RE, ki smo jih izračunali za posamezna povprečja rezultatov meritev, se razlikujejo pri vsakem parametru. Razlika je prisotna tudi med nivoji kontrolnega materiala (PC U1 in PC U2). Največjo RE smo dobili pri Prl (16,58 %) za nizek nivo PC U1, najmanjšo pa pri Lh (6,89 %) za visok nivo PC U2. To pomeni, da povprečna vrednost rezultatov, ki smo jo dobili za Prl za PC U1 (13,15 µg/L), največ odstopa od ciljne povprečne vrednosti rezultatov, ki jo navaja proizvajalec (11,28 µg/L), oz. je najmanj točna meritev, in da povprečna vrednost rezultatov, ki smo jo dobil za Lh za PC U2 (55,69 IU/L), najmanj odstopa od povprečne vrednosti rezultatov, ki jo navaja proizvajalec (52,1 IU/L), oz. je najbolj točna meritev. Le pri ocenjevanju točnosti merjenja Fsh, smo dobili boljšo točnost merjenja/manjšo RE na nizkem nivoju PC U1 (9,25 %) kot na visokem PC U2 nivoju (11,1 %). Pri Lh in Prl je točnost merjenja boljša/manjša RE na visokem nivoju PC U2 (Lh: 6,89 %, Prl: 10,91 %) kot na nizkem nivoju PC U1 (Lh: 12,38 %, Prl:16,58 %).

Glede na dobljene rezultate točnosti merjenja, izračunane RE in primerjavo s ciljnimi vrednostmi, ki jih je podal proizvajalec, lahko zaključimo, da se naše povprečne vrednosti meritev za vse tri parametre nekoliko razlikujejo od ciljnih vrednosti proizvajalca, oz. so nekoliko višje (na obeh nivojih). RE ne presegajo 15 %, razen v primeru Prl za PC U1 (16,58 %). Povprečne vrednosti rezultatov meritev za vse 3 parametre so znotraj referenčnih območij, ki jih je podal proizvajalec, in zato lahko zaključimo, da so naši rezultati točnosti sprejemljivi. Vzroki za omenjena odstopanja so lahko različni. Poleg vprašanja stabilnosti reagentov in kontrolnega materiala (shranjevanje in rok uporabe odprtih raztopin) menim, da je vzrok takšnih rezultatov moja neizkušenost pri rokovanju z omenjenimi raztopinami – pravilna homogenizacija in temperiranje kontrolnega materiala (čas, ki je potekel od raztapljanja do alikvotiranja in zmrzovanja kontrolnega materiala). Mogoče bi bili rezultati boljši, če bi zaradi stabilnosti kontrolnega materiala merjenja izvedli v krajšem času (npr. 5 ali 10 dni) in bi bilo število meritev večje (vsak dan za vsak parameter po vsaj 5 meritev). Seveda bi bilo to možno, če bi imeli na razpolago dovolj kontrolnega materiala, ki bi ga razdelili in zmrzovali v večjih količinah.

Ocena ujemanja rezultatov Fsh, Lh in Prl

Ujemanje rezultatov Fsh smo ocenili tako, da smo interpretirali diagrama Bland-Altmana ali diagram razlik in Krouwer-Montija ali gorski diagram. Po *interpretaciji diagrama razlik* smo zaključili, da sta pri merjenju Fsh prisotni obe napaki: sistematična in slučajna. V primeru sistematične napake smo ugotovili, da analizator Cobas e 411, ki za merjenje uporablja ECLIA metodo, v povprečju daje za 0,15 IU/L višje rezultate kot analizator AxSYM, ki za merjenje uporablja MEIA metodo. Ugotovili smo tudi to, da ta napaka ni značilna oz. velika (95 % IZ [-0,57; 0,87 IU/L]). Iz razpona 95-odstotnih IU [-4,23, 4,52 IU/L] smo zaključili, da je prisotna variabilnost oz. slučajna napaka. Prisoten je tudi trend, kar pomeni, da se povprečna napaka spreminja z velikostjo merjene vrednosti, oz. da so pri višjih vrednosti Fsh večje razlike med Cobasom e 411 i AxSYMom. Heteroskedastičnosti v primeru merjenja Fsh ni. Vrh krivulje *gorskega diagrama* (ki se ne nahaja na vrednosti "0") potrjuje zaključke, dobljene na osnovi interpretacije diagrama razlik, oz. da je prisotna sistematična napaka. Mediana, ki znaša 0,37 IU/L, pomeni, da analizator Cobas e 411 v povprečju daje za 0,37 IU/L višje rezultate kot analizator AxSYM. Ta ugotovitev potrjuje Bland-Altman analizo, da analizator Cobas e 411 daje višje rezultate kot analizator AxSYM, ampak je vrednost nekoliko večja (za 0,22 IU/L). Na osnovi izračuna 5. in 95. percentila smo zaključili, da se 90 % razlik v rezultatih Fsh nahaja znotraj [-3,66; 2,15 IU/L]

intervala. Pri merjenju Fsh smo ugotovili prisotnost sistematične in slučajne napake ter prisotnost še enega odklona – trenda. Zaradi tega lahko s statističnega vidika zaključimo, da ujemanje rezultatov ni ustrezno. Po drugi strani sistematična napaka ni bila značilna oz. velika in bi se dala računsko korigirati, če ne bi bili prisotni drugi odkloni, kot sta variabilnost in trend. Velika variabilnost napak je resna pomanjkljivost, še posebej če je prisotna tudi sistematična napaka in skupaj bistveno vplivata na oceno sprejemljivosti ujemanja. Zaželeno je, da je skupna variabilnost metod čim manjša. Sprejemljiva variabilnost (slučajna napaka) je tista, ki bistveno ne vpliva na interpretacijo rezultata oz. na samo diagnostiko. O sprejemljivosti variabilnosti, ki smo jo dobili pri merjenju Fsh, bi se morali posvetovati z zdravnikom. Pomembno je, da se variabilnost v primeru našega merjenja Fsh ne spreminja, oz. da ni heteroskedastičnosti, in da sistematična napaka, ki je pogosto povezana z instrumentom ali nepravilnim izvajanjem merjenja, ni značilna. Če pa bi bila heteroskedastičnost prisotna, bi morali logaritemsko transformirati podatke.

Ujemanje rezultatov Lh smo ocenili na podoben način kot pri Fsh. Razlika je ta, da smo o ustreznosti ujemanja zaključili na osnovi *interpretacije diagrama razlik*, ki prikazuje relativne vrednosti ujemanja zaradi preglednejše in enostavnejše interpretacije. Tudi v primeru merjenja Lh sta prisotni obe napaki: sistematična, ki pomeni, da analizator Cobas e 411 v povprečju daje za 23,1 % višje rezultate kot analizator Axsym, in slučajna napaka, ki je razvidna iz razpona 95-odstotnih IU [-39,0 ; 86,0 %]. Sistematična napaka je v tem primeru velika oz. značilna, ker se povprečje razlik značilno razlikuje od vrednosti "0", oz. 95 % IZ [13,3; 32,8 %] ne vsebuje vrednosti "0" (pri stopnji tveganja 5 %). Iz regresijske premice smo zaključili, da so pri višjih koncentracijah Lh večje razlike med Cobasom e 411 in Axsymom (proporcionalen odnos), oz. da je večja povprečna napaka pri višjih koncentracijah Lh. Heteroskedastičnosti ni. Tudi interpretacija *gorskega diagrama* potrjuje prisotnost sistematične napake pri merjenju Lh. V tem primeru analizator Cobas e 411 daje višje rezultate kot analizator Axsym (za 1,23 IU/L), kot je pokazala analiza Blanda in Altmana. Iz 5. in 95. percentila smo zaključili, da se 95 % dobljenih Lh rezultatov nahaja znotraj [-1,09; 3,28 IU/L] intervala. Po končanih meritvah Lh parametra z omenjenimi statističnimi analizami smo ugotovili, da so prisotne: pristranskost, variabilnost, trend in da heteroskedastičnosti ni. Iz tega lahko sklepamo, da ujemanje rezultatov v primeru Lh ni ustrezno. Ocena ujemanja je celo slabša kot pri Fsh, ker je sistematična napaka v primeru Lh značilna oz. velika.

Ujemanje rezultatov Prl smo tudi statistično ocenili kot neustrezno ujemanje. Iz *diagrama razlik* je razvidno, da Cobas e 411 v povprečju daje za 17,4 % višje rezultate kot analizator Axsym. To pomeni, da je prisotna sistematična napaka ki je značilna (95-odstotni IZ [14,9;19,9 %]). Poleg značilne sistematične napake je prisotna tudi slučajna napaka, ki je vidna iz 95-odstotnega IU [1,0; 34,0 %] intervala. Od ostalih odklonov je prisoten trend, heteroskedastičnosti ni. Prisotnost pristranskosti potrjuje tud *gorski diagram*, iz katerega je razvidno, da analizator Cobas e 411 daje za 2,33 µg/L višje rezultate kot analizator Axsym. Na osnovi izračuna 5. in 95. percentila lahko zaključimo, da se 95 % dobljenih Prl rezultatov nahaja znotraj [0,724; 6,674 µg/L] intervala. Rezultati Fsh, Lh in Prl, ki smo jih izmerili na obeh analizatorjih z različnima metodama, se s statističnega vidika ne ujemajo, oz. smo njihovo ujemanje ocenili za neustrezno. Pri vseh testiranih parametrih so bili prisotni odkloni: sistematična napaka (pristranskost), slučajna napaka (variabilnost) in trend (spreminjanje povprečne napake z velikostjo merjene vrednosti). Heteroskedastičnosti pri merjenju parametrov ni bilo. Pri merjenju Fsh sistematična napaka ni bila značilna, pri Lh in Prl pa je bila značilna. Zanimivo in pomembno je to, da analizator Cobas e 411 pri vseh testiranih parametrih meri višje rezultate kot analizator Axsym. Variabilnost je bila pri parametrih različna. Njene sprejemljivosti s kliničnega vidika nisem ocenila, ker ni v domeni te naloge in zahteva dodatna znanja in izkušnje. V sodelovanju z zdravniki, ki so specialisti na področju ginekologije, bi bila interpretacija gorskega diagrama in diagrama razlik v tem primeru gotovo boljša in popolnejša. Pri vseh parametrih smo odkrili, da so razlike med rezultati, ki jih podajata oba analizatorja, večje pri višjih koncentracijah. Pomembno je tudi to, da se variabilnost v nobenem primeru merjenja ni spreminjala. Seveda je zaželeno, da se metodi sistematično ne razhajata in da je njuna (skupna) variabilnost čim manjša (32). Iz enačbe klasičnega modela merjenja je razvidno, da te napake lahko ovrednotimo le s pomočjo razlik parov meritev, ki so opravljene z ECLIA in MEIA metodo. Pri tem je pomembno dejstvo, da ni utemeljeno, dotlej rabljeno metodo (v našem primeru MEIA metodo), uporabiti kot zlati standard in da je pri ocenjevanju ujemanja v ospredju praktična sprejemljivost (32). Takšna sprejemljivost je odvisna od konkretnih okoliščin, kot so: namen meritve (presejalna ali potrditvena), vrsta in zgradba analita (homogeni in heterogeni analiti), namen uporabe analizatorja (npr. v enoti za intenzivno nego, urgentni enoti, patronažni enoti) ... Zato bi bilo pred izvedbo postopkov potrebno opredeliti meje sprejemljivosti ujemanja (32). Za ta korak menim, da je potrebno posvetovanje z zdravnikom, specialistom na tem področju, ki

naše rezultate meritev vrednoti in interpretira. Ujemanja izmerjenih rezultatov nismo ocenjevali s kliničnega vidika, ampak s statističnega. Ne glede na to nas zanima, zakaj je prišlo do takšnih neskladjih v rezultatih. Vzrokov je verjetno več. Avtorja B. Hinney in W. Wuttke (14) navajata, da lahko imunološki testi/metode različnih proizvajalcev dajejo različne rezultate Fsh in Lh v vzorcih pacientov, ne glede na to, ali so bila uporabljena monoklonska ali poliklonska Ab in ali sta testa bila kalibrirana po istem standardu in protokolu. Avtorja sta mnenja, da so neskladja v rezultatih lahko posledica (14):

- prisotnosti nespecifičnih, motečih snovi, ki interferirajo (ta primer je bolj izražen pri RIA metodi kot pri imunometričnih testih),
- različne selektivnosti protiteles do različnih glikoziliranih oblikah Fsh in Lh, ki kot genetske variacije vključujejo razširjene populacije variabilnih glikoziliranih oblik,
- sprememb v epitopih (vezavnih mest na antigenu), ki so posledica nekaterih bolezni, kot je renalna insuficienca in
- kinetičnih stanj imunoloških testov/metod.

Kot primer omenjenih neskladnosti pri določanju Fsh navajajo, da je RIA metoda pokazala < 1 % navzkrižne reaktivnosti z Lh, Tsh in hCG (14). V uporabi sta 2 različna mednarodna referenčna materiala: WHO 1 st IRP 78/549, ki je minimalno prečiščen izvleček hipofize, dokler je novejši mednarodni ref. material WHO 83/575 bolj prečiščen (14). Imunološki testi, ki uporabljajo omenjene standarde in poliklonska Ab, bodo dali višje rezultate Fsh v vzorcih pacientov kot imunološki testi, ki uporabljajo monoklonska Ab (14). V primeru neskladnosti rezultatov pri določanju Lh sta poudarila, da je prisoten problem v standardizaciji Lh testov (14). Vzrok za to so različne vrste Ab (14). Nekatera protitelesa namreč dobro reagirajo s prosto β -verigo, dokler druga zaznajo hCG, ampak tisto skupino, ki je bolj specifična za Lh (14). Slednja protitelesa so tako specifična, da sploh ne reagirajo z genetskimi Lh oblikami/variantami (14). Posledica tega so lahko lažno znižane vrednosti Lh v vzorcih pacientov (14). Takšne oblike se v nekaterih populacijah pojavljajo zelo redko, medtem ko je v drugih populacijah takšnih oblik celo do 25 % (14). Za določanje vrednosti Fsh in Lh se bolj uporabljajo imunometrični testi, ki uporabljajo monoklonska Ab (14). Ti testi so bolj občutljivi in njihova izvedba je hitrejša v primerjavi s RIA testi (14). Pri določanju prolaktina so tudi pričakovana neskladja v rezultatih, ki so izmerjeni z različnimi metodami različnih proizvajalcev (36). Avtor je mnenja, da je vzrok za to molekulska heterogenost prolaktina (36). Primerljivi rezultati se lahko dosežejo z uporabo

istega referenčnega materiala za kalibracijo metode (36). Pomembna je tudi pretvorba enot v mIU/L in navedba pretvorbenega faktorja (36). Dostopen referenčni kalibracijski materiali so: WHO 1st IRP 75/504, WHO 2nd IS 83/562 in WHO 3rd IS 84/500 (36).

Naši rezultati niso slabo primerljivi zaradi slednjega razloga, kajti obe metodi (ECLIA in MEIA) sta kalibrirani po istem mednarodnem standardu, in sicer: Fsh-2nd IRP WHO referenčni standard 78/549 (7,19), Lh-2nd IS (NIBSC) 80/552 (8,20) in Prl-3rd IRP WHO referenčni standard 84/500 (9, 21). Lahko so posledica uporabe različnih vrst Ab, ki so različno specifična do Ag, ki smo jih določali oz. do njihovih genetskih variant/oblik. V našem primeru MEIA metoda (Axsym) uporablja v reagentu 1 (za določitev Fsh in Lh) mišja *monoklonska* Ab in v reagentu 2 kozja *poliklonska* Ab (19, 20), metoda ECLIA (Cobas e 411) v obeh reagentih uporablja mišja *monoklonska* Ab (7, 8). Za merjenje Prl, MEIA v reagentu 1 uporablja mišja *monoklonska* Ab in v reagentu 2 zajčja *poliklonska* Ab (21), ECLIA pa v obeh reagentih uporablja samo mišja *monoklonska* Ab (9). Verjetno je na dobljene rezultate vplivala tudi moja neizkušenost pri delu z novim analizatorjem, reagenčnim in kontrolnim materialom (predpriprava, temperiranje in mešanje kontrolnih vzorcev) ter sama stabilnost testiranih analitov (pomemben je čas od odvzema do analize vzorca in shranjevanje). Z izkušnjami, ki sem jih do zdaj pridobila, bi verjetno ustvarila boljše pogoje za analiziranje vzorcev. To pomeni, da bi bila bolj pozorna pri izvedbi preanalitičnih postopkov, čas, ki je potekel od odvzema vzorca do obdelave, bi bil veliko krajši, vzorce bi sproti zamrzovala na -20 °C in bi jih nato vse skupaj analizirala pod enakimi pogoji. Zanimivo bi bilo analizirati vzorce pacientov na več različnih koncentracijskih nivojih. Tudi to bi lahko vplivalo na oceno ujemanja.

Imunološki testi so zadnja leta zelo napredovali. Po uvedbi prvega RIA testa so se razvile alternativne metode, ki uporabljajo manj nevarne molekule označevalcev (37). Rokovanje s takšnim materialom je bolj enostavno in varno za laboratorijske delavce. Pomemben je tudi dosežek na področju izdelave Ab (37). Danes so dostopna monoklonska Ab, ki so visoko specifična do posameznih analitov, kar pomeni tudi manj navzkrižnih reakcij (37). Poleg omenjenega je na izboljšanje ponovljivosti in občutljivosti ter na hitrost izvedbe posam. testov vplivala avtomatizacija (37). Analizatorji novih generacij so večinoma popolnoma avtomatizirani. Vsi omenjeni dosežki na področju imunoloških testiranj so omogočili hitrejšo analizo vzorcev, kar za pacienta pomeni krajši čas hospitalizacije ali hitrejšo postavitve diagnoze in bolj učinkovito zdravljenje (37). Po drugi strani to omogoča tudi zmanjševanje stroškov zdravstvenih ustanov. Rezultati Fsh, Lh in Prl, ki smo jih merili

na starejšem analizatorju Axsym in novem analizatorju Cobasu e 411, ne kažejo ustreznega ujemanja. To smo statistično ocenili s primernimi metodami Blanda in Altmana ter Krouwerja in Montija. Poleg tega statističnega vidika pa je pri ocenjevanju ujemanja pomembna tudi praktična sprejemljivost. Serumsko določanje omenjenih hormonov je samo del večstopenjske diagnostike motenj ženskega spolnega cikla. Poleg anamneze in fizičnih pregledov je potrebno narediti še potrditvene teste – hormonske teste (progesteronski test, estrogensko-progesteronski test, prolaktin-stimulacijski test), ultrazvočno diagnostiko, RTG in MR. Potrebna so tudi ponovna merjenja hormonov po določenem času zaradi spremljanja nihanja vrednosti. ECLIA metoda, ki jo uporablja nov analizator Cobas e 411, je validirana s strani proizvajalca. Mi smo je verificirali, oz. smo ocenili, da omogoča merjenje ponovljivih in točnih rezultatov. Iz teh razlogov smo zaključili, da novo metodo lahko uporabljamo za merjenje serumskih koncentracij Fsh, Lh in Prl, oz. da lahko obstoječi analizator Axsym zamenjamo z novim – Cobasom e 411. Uporabnike naših storitev (zdravnike) smo obvestili o menjavi metod določanja posameznih imunoloških parametrov. Podali smo jim nove referenčne vrednosti in merilna območja za vsak posamezan parameter in jih opozorili, da nova metoda meri nekoliko višje rezultate kot predhodna, ampak da ima tudi širša merilna območja. Poslali smo jim tudi dodatne potrebne podatke, ki se nanašajo na preanalitične, analitične in poanalitične postopke, ter podatke o prednosti metode. Popolnoma avtomatizirani analizator Cobas e 411 in njegova inovativna ECL tehnologija nam omogočata točne, natančne, hitre in učinkovite meritve različnih parametrov, kot so: označevalci ščitnične funkcije, parametri za diagnostiko anemij, parametri za testiranje plodnosti/hormonski testi, označevalci srčne funkcije, parametri za ugotavljanje nosečnosti, tumorski označevalci, parametri infektivnih bolezni, kostni označevalci in številni drugi (38). Delo na njem je enostavno, niso potrebne predpriprave reagentov (manjše je število napak, ki bi vplivale na rezultat), ima širša merilna območja kot analizator Axsym, ki zmanjšujejo potrebe po redčenjih in ponovitvah merjenja (38). Poleg tega ECL tehnologija zagotavlja visoko analitično občutljivost (potrebni so majhni volumni vzorcev, možnost uvedbe inovativnih testov) in omogoča zelo hitre rezultate nujnih preiskav (znotraj 9 minut, STAT aplikacija za teste: hCG, troponin T 4. generacije, izoencim MB kreatin kinaze (CK-MB), mioglobin, paratiroidni hormon (Pth) (38)). Reagenčni, kalibracijski in kontrolni material je označen s črtnimi kodami, ki jih analizator avtomatično prebere, tak sistem omogoča hitro, robustno in varno izvedbo analiznega postopka (38). Za razliko od do sedaj uporabljane MEIA metode, ECLIA

metoda za določanje Fsh, Lh in Prl uporablja v obeh reagentih monoklonska Ab, ki so visoko specifična. Posledica tega je veliko manj navzkrižnih reakcij (38).

6. SKLEPI

- Merjenje koncentracij hormonov (Fsh, Lh in Prl) ženskega spolnega cikla smo opravili z MEIA metodo na starem analizatorju Axsym (proizvajalca Abbott) in z ECLIA novo tehnologijo na novem analizatorju Cobas e 411 (proizvajalca Roche). Z enostavnimi statističnimi metodami Blanda in Altmana ter Krouwerja in Montija smo vrednotili ujemanja metod. Po omenjenih statističnih analizah smo ocenili, da je ujemanje pri vseh 3 parametrih slabo oz. neustrezno. To smo zaključili na osnovi prisotnih sistematičnih in slučajnih napak.
- Nekoliko boljše rezultate ujemanja smo dobili pri merjenju Fsh, kjer sistematična napaka ni bila značilna (95-odstotni IZ [-0,57; 0,87 IU/L]). Pri vseh treh parametrih smo opazili trend – da so razlike med rezultati večje pri višjih vrednosti parametrov. Heteroskedastičnosti ni bilo v nobenem primeru.
- Zaključili smo tudi to, da analizator Cobas e 411 v povprečju meri nekoliko višje vrednosti vseh testnih parametrov kot analizator Axsym (pri Fsh za 0,15 IU/L, pri Lh za 23,1 % in pri Prl za 17,4 %).
- Krouwer-Montijeve analize potrjujejo analize Blanda in Altmana o neustreznosti ujemanja pri vseh treh parametrih. Potrjuje tudi to, da v povprečju višje rezultate meri analizator Cobas e 411 (pri Fsh za 0,37 IU/L, pri Lh za 1,23 IU/L in pri Prl za 2,33 µg/L).
- Nova ECLIA metoda je bila ustrezno validirana s strani proizvajalca. Mi smo metodo verificirali tako, da smo določili njeno natančnost (ponovljivost) in točnost.
- Natančnost (znotraj-serijska in meddnevna ponovljivost), ki smo jo ocenili na osnovi izračunanega KV (%), je bila zadovoljiva pri vseh treh parametrih. To pomeni, da je celokupni KV znotraj priporočljivega kriterija od 1–5% (Fsh 4,19 %, Lh 3,24 %, Prl 2,67 %) in primerljiv s KV, ki jih je podal proizvajalec (Fsh 1,4 %, Prl 4,0 %).
- KV pri Lh nismo primerjali s KV proizvajalca, ker sta se naša povprečja razlik rezultatov razlikovala od povprečij razlik rezultatov proizvajalca. Najboljša natančnost (meddnevna ponovljivost) merjenja je bila pri Prl (najmanjši KV) in najslabša pri Fsh (najvišji KV).
- Točnost merjenja vseh parametrov je bila zadovoljiva na nizkem (PC U1) in visokem koncentracijskem nivoju (PC U2) kontrolnega materiala. To pomeni, da so

bili vsi izmerjeni rezultati oz. povprečja izmerjenih rezultatov znotraj referenčnih območij, ki jih je podal proizvajalec. Na osnovi izračunanih relativnih napak (za povprečja rezultatov) smo zaključili, da je bila najslabša točnost merjenja pri Prl (RE za PC U1 16,58 %) in najboljša točnost pri Lh (RE za PC U2 6,89 %).

- Pri izbiri "statističnega orodja" za analiziranje in vrednotenje ujemanja metod merjenja, je pomembno, da nobene metode ne obravnavamo kot "zlati standard" in da je vedno v ospredju praktična sprejemljivost. V praksi je serumsko določanje naših testnih hormonov samo del večstopenjske diagnostike motenj ženskega spolnega cikla, ki omogoča spremljanje stanja, oz. daje vpogled v nihanja in spremembe stanja. Nikakor ni edina diagnostična metoda. Zato so naši rezultati ujemanja s praktičnega vidika sprejemljivi za vse tri parametre.
- Nova ECL tehnologija, ki jo analizator Cobas e411 uporablja za meritev Fsh, Lh in Prl, ima številne prednosti: širše merilno območje (zmanjšano število ponovitev in manj redčenja), visoko analitično občutljivost (zahteva manjši volumen vzorca) in možnosti hitrejše izvedbe testov (posebej nujnih, kot so: troponin, β -hCG, mioglobin, CK-MB ...). Poleg tega so v obeh reagentih uporabljena visoko specifična monoklonska Ab, kar preprečuje različne navzkrižne reakcije (MEIA uporablja monoklonska in poliklonska Ab).
- Ne glede na to, da sta ujemanji rezultatov merjenja do sedaj uporabljene MEIA metode in nove ECLIA metode neustrezni, ECLIA tehnologija omogoča merjenja natančnih in točnih rezultatov Fsh, Lh in Prl. Poleg tega ima širša merilna območja in omogoča hitrejšo analizo določenih analitov. Zaradi enostavnejšega in varnega rokovanja ter izboljšane programske opreme sta analizator Cobas e 411 in nova ECL tehnologija primerna za merjenja Fsh, Lh in Prl v našem laboratoriju.

7. LITERATURA

1. Šimunić V. Menstruacijski ciklus.

<http://www.poliklinika-ivf.hr/docs/ginekologija/V.Simunic%20%20Menstruacijski%20ciklus.pdf> (dostopno: 22. 12. 2013).

2. Osredkar J. Hormonska diagnostika. In: Seminar za inženirje in tehnike laboratorijske medicine, Zbornik predavanj. SZKK, 2010.

3. Kraševac M. Agonisti in antagonisti steroidnih spolnih hormonov. Seminarska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 1997: 1–22.

4. Herman M. Primerjava dveh metod za določanje spolne hormone vezočega globulina (SHBG). Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, 2012: 1–2.

5. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Estrogen> (dostopno: 18. 1. 2013).

6. Meden-Vrtovec H, Vrtovec B. Motnje v menstrualnem ciklusu. Obzornik zdravstvene nege, 1978; 12: 378–381.

7. Roche Diagnostiscs. Elecsys and cobas e analyzers: Follicle-stimulating hormone package insert (REF 11775863 122): Intended use; Summary, Roche Diagnostiscs GmbH, Mannheim, 2010-V17; 1–3.

8. Roche Diagnostiscs. Elecsys and cobas e analyzers: Luteinizing hormone package insert (REF 11732234 122): Intended use; Summary, Roche Diagnostiscs GmbH, Mannheim, 2007-V 15; 1–3.

9. Roche Diagnostiscs. Elecsys and cobas e analyzers: Prolactin II package insert REF 03203093 190): Intended use; Summary, Roche Diagnostiscs GmbH, Mannheim, 2010-V4; 1–4.

10. Guyton AC, Hall JE. Pregnancy and Lactation. In: Textbook of Medical Physiology. 9thed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1996: 1045–1046.

11. Guyton A.C. Hall J.E. Female Physiology Before Pregnancy; and the Female hormones. In: Textbook of Medical Physiology. 9th ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1996: 1017–1026.

12. Šimunić V. Poremećaji menstruacijskog ciklusa: Amenoreje i Oligomenoreje, <http://www.ivf.hr/docs/ginekologija/POREMECAJI%20MENSTRUACIJSKOG%20CIKLUSA.pdf> (dostopno: 8. 10. 2014).

13. Topalović Z. Značajke i nepravilnosti menstruacijskog ciklusa. Medicus. 2010; 19: 23–24.

14. Wuttke W, Hinney B. Ovarian function. In: Lothar T. Clinical Laboratory Diagnostics. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. 1st ed. Frankfurt, Main, Germany: TH-Books, 1998: 1091–1094.
15. Wallach JB. Endocrine Diseases. In: Handbook of Interpretation of diagnostic tests. 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 356–375.
16. Osredkar J. Marc J. Laboratorijski postopki. In: Laboratorijska medicina I. Učbenik za študente medicine, farmacije in laboratorijske biomedicine. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2012: 143–144.
17. Abbott Diagnostics. Learning Guide Immunoassay.
http://www.drtaandpartners.com/wp-content/uploads/2014/05/learning_immunoassay.pdf
(dostopno: 8. 10. 2014).
18. Roche Diagnostiscs. COBI-CD. Compendium of Background Information: Test principles , Roche Diagnostiscs GmbH, Mannheim, Germany, 2001–2006: 5–12.
19. Abbott Axsym System. FSH package insert (7A60) , Division, USA, 2005: 1–7.
20. Abbott Axsym System. LH package insert (REF 7A61) , Abbott Laboratories Diagnostics Division, USA, 2003: 1–7.
21. Abbott Axsym System. Prolactin package insert (REF 7A62) , Abbott Laboratories Diagnostics Division, USA, 2003: 1–7.
22. Piskar M. Priporočeni postopek za odvzem venske krvi. SZKK, 1999.
23. Roche Diagnostiscs. ProCell (REF 11662988 122), Roche Diagnostiscs GmbH Mannheim, Germany, 2013; V 14.0.
24. Roche Diagnostiscs. CleanCell (REF 11662970 122), Roche Diagnostiscs GmbH Mannheim, Germany, 2013; V 18.0.
25. Roche Diagnostiscs. FSH CalSet II (REF 03032680 122), Roche Diagnostiscs GmbH Mannheim, Germany, 2010; V 8.0.
26. Roche Diagnostiscs. LH CalSet II (REF 03561097 190), Roche Diagnostiscs GmbH Mannheim, Germany, 2010; V 8.0.
27. Roche Diagnostiscs. Prolactin II CalSet (REF 03277356 190), Roche Diagnostiscs GmbH Mannheim, Germany, 2010; V 4.0.
28. Roche Diagnostiscs. PreciControl Universal (REF 11731416 190; REF 11731416 922-QCS), Roche Diagnostiscs GmbH Mannheim, Germany, 2010; V 5.0.

29. Dvoršak K. Vrednotenje metod v imunokemiji, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010: 3–7.

30. Lederer V. Uvedba določanja prostatno specifičnega antigena v serumu z elektroluminiscenčno imunokemijsko metodo. Diplomski naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2009: 22–23.

31. Furek Z. Uvajanje preiskave v rutinsko delo. Delovno navodilo, ZDM Služba za laboratorijsko diagnostiko, Maribor, 2008: 1–2.

32. Lajovic J. Ujemanje metod merjenja-praktični pristop. Strokovna revija ISIS, 2010; 10: 44-49.

33. Bland. J.M. Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.

<https://www-users.york.ac.uk/~mb55/meas/ba.pdf> (dostopno: 10. 10. 2014).

34. Locatelli I. Osnove biomedicinske statistike. Biomedicinska informatika, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2014: 23–43.

35. Krsnik M. Statistična primerjava dveh metod ob uvajanju novega testa, Univerzitetni klinični center Ljubljana, KIKKB, Ljubljana.

36. Werder v. K. Prolactin. In: Lothar T. Clinical Laboratory Diagnostics. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. 1st ed. Frankfurt, Main, Germany: TH-Books, 1998: 1082–1083.

37. Hendriks H.A. Kortlandt W. Verweij W.M. Analytical performance comparison of five new generation immunoassay analyzers.

<https://www.nvkc.nl/publicaties/documents/2000/nr%203/p170/2000-3-170.pdf>

(dostopno: 10. 10. 2014).

38. Cobas, Cobas e and Life needs answers. Cobas e 411 analyzer: The immunoassay analyzer Cobas e 411 2nd generation platform of ECL technology

http://www.aub.edu.lb/fm/cmop/downloads/cobas_e_411_EN.pdf

(dostopno: 8. 10. 2014).

PRILOGE

Priloga 1. Vrednotenje ujemanja rezultatov **Fsh** z Bland-Altman analizo

N (štev. meritev)	COBAS (IU/L)	AXSYM (IU/L)	COBAS – AXSYM (IU/L)	COBAS - AXSYM (%)	(COBAS +AXSYM) /2 (IU/L)
1	7,46	7,32	0,14	1,9	7,39
2	42,02	52,08	-10,06	-21,4	47,05
3	5,64	5,67	-0,03	-0,5	5,66
4	21,03	21,62	-0,59	-2,8	21,33
5	5,07	5,34	-0,27	-5,2	5,21
6	24,89	28,22	-3,33	-12,5	26,56
7	13,26	12,53	0,73	5,7	12,90
8	29,90	28,22	1,68	5,8	29,06
9	7,72	6,99	0,73	9,9	7,36
10	5,82	5,34	0,48	8,6	5,58
11	17,19	15,39	1,80	11,0	16,29
12	9,79	9,65	0,14	1,4	9,72
13	37,51	36,06	1,45	3,9	36,79
14	11,30	9,31	1,99	19,3	10,31
15	54,98	52,91	2,07	3,8	53,95
16	17,59	16,49	1,10	6,5	17,04
17	8,06	7,21	0,85	11,1	7,64
18	4,31	4,32	-0,01	-0,2	4,32
19	1,78	1,66	0,12	7,0	1,72
20	89,28	94,27	-4,99	-5,4	91,78
21	6,48	6,46	0,02	0,3	6,47
22	3,27	2,90	0,37	12,0	3,09
23	7,86	7,43	0,43	5,6	7,65
24	19,31	16,04	3,27	18,5	17,68
25	8,48	7,17	1,31	16,7	7,83
26	5,24	5,05	0,19	3,7	5,15
27	6,16	5,97	0,19	3,1	6,07
28	9,90	9,37	0,53	5,5	9,64
29	6,56	5,96	0,60	9,6	6,26
30	4,81	4,86	-0,05	-1,0	4,84
31	6,64	7,15	-0,51	-7,4	6,90
32	6,20	5,87	0,33	5,5	6,04
33	6,88	6,42	0,46	6,9	6,65
34	5,61	5,49	0,12	2,2	5,55
35	20,02	18,37	1,65	8,6	19,20
36	5,54	5,41	0,13	2,4	5,48
37	64,43	61,98	2,45	3,9	63,21
Povprečje			0,15	3,9	
SD			2,23	8,0	

Povprečje razlik (IU/L)	Standardni odklon (IU/L)	95%IZ za aritm.sred. (IU/L)	95% IU (IU/L)
0,15	2,23	[-0,57; 0,87]	[-4,23; 4,52]

Povprečje razlik (%)	Standardni odklon (%)	95%IZ za aritm.sred. (%)	95% IU (%)
3,9	8,0	[1,3; 6,5]	[-12,0; 19,0]

Priloga 2. Vrednotenje ujemanja rezultatov **Lh** z Bland-Altman analizo

N (štev. meritev)	COBAS (IU/L)	AXSYM (IU/L)	COBAS – AXSYM (IU/L)	COBAS - AXSYM (%)	(COBAS +AXSYM) /2 (IU/L)
1	3,46	3,00	0,46	14,2	3,23
2	13,73	14,81	-1,08	-7,6	14,27
3	3,89	2,67	1,22	37,2	3,28
4	8,37	7,39	0,98	12,4	7,88
5	7,16	6,92	0,24	3,4	7,04
6	7,11	6,09	1,02	15,5	6,60
7	11,06	9,23	1,83	18,0	10,15
8	64,71	50,57	14,14	24,5	57,64
9	11,95	10,11	1,84	16,7	11,03
10	7,55	7,47	0,08	1,1	7,51
11	10,80	10,89	-0,09	-0,8	10,85
12	10,36	8,78	1,58	16,5	9,57
13	4,35	3,12	1,23	32,9	3,74
14	5,37	3,57	1,80	40,3	4,47
15	4,40	3,42	0,98	25,1	3,91
16	4,78	3,54	1,24	29,8	4,16
17	9,76	7,89	1,87	21,2	8,83
18	5,32	4,85	0,47	9,2	5,09
19	14,55	11,43	3,12	24,0	12,99
20	8,05	6,74	1,31	17,7	7,40
21	6,44	4,97	1,47	25,8	5,71
22	11,11	10,69	0,42	3,9	10,9
23	4,39	3,16	1,23	32,6	3,78

24	8,49	6,94	1,55	20,1	7,72
25	6,84	4,88	1,96	33,4	5,86
26	8,68	6,24	2,44	32,7	7,46
27	9,47	6,19	3,28	41,9	7,83
28	20,84	22,25	-1,41	-6,5	21,55
29	8,20	6,23	1,97	27,3	7,22
30	0,10	0,00	0,10	200,0	0,05
31	42,04	40,49	1,55	3,8	41,27
32	144,30	120,88	23,42	17,7	132,59
33	12,14	12,26	-0,12	-1,0	12,20
34	4,17	2,85	1,32	37,6	3,51
35	9,24	7,13	2,11	25,8	8,19
36	36,61	38,04	-1,43	-3,8	37,33
37	3,01	1,95	1,06	42,7	2,48
38	4,64	2,96	1,68	44,2	3,80
39	5,70	4,88	0,82	15,5	5,29
40	32,86	33,95	-1,09	-3,3	33,41
41	27,79	26,59	1,20	4,4	27,19
Povprečje			1,90	23,1	
SD			4,15	31,9	

Povprečje razlik (IU/L)	Standardni odklon (IU/L)	95%IZ za aritm.sred. (IU/L)	95%IU (IU/L)
1,90	4,15	[0,63; 3,17]	[-6,23;10,03]

Povprečje razlik (%)	Standardni odklon (%)	95%IZ za aritm.sred. (%)	95% IU (%)
23,1	31,9	[13,3; 32,8]	[-39,0; 86,0]

Priloga 3. Vrednotenje ujemanja rezultatov **Prl** z Bland-Altman analizo

N (štev. meritev)	COBAS (µg/L)	AXSYM (µg/L)	COBAS – AXSYM (µg/L)	COBAS - AXSYM (%)	(COBAS +AXSYM) /2 (µg/L)
1	7,29	6,55	0,74	10,7	6,92
2	11,63	10,72	0,91	8,1	11,18
3	13,31	12,20	1,11	8,7	12,76
4	26,46	22,55	3,91	16,0	24,51
5	12,86	10,89	1,97	16,6	11,88
6	5,62	4,90	0,72	13,7	5,26
7	14,70	12,37	2,33	17,2	13,54
8	15,61	13,52	2,09	14,3	14,57
9	27,88	20,16	7,72	32,1	24,02
10	14,64	12,15	2,49	18,6	13,40
11	19,83	17,08	2,75	14,9	18,46
12	16,59	14,73	1,86	11,9	15,66
13	9,12	7,35	1,77	21,5	8,235
14	17,59	14,06	3,53	22,3	15,83
15	15,79	12,11	3,68	26,4	13,95
16	21,48	16,43	5,05	26,6	18,96
17	24,49	18,34	6,15	28,7	21,42
18	17,99	15,31	2,68	16,1	16,65
19	12,65	10,77	1,88	16,1	11,71
20	10,70	9,61	1,09	10,7	10,16
21	15,11	11,89	3,22	23,9	13,50
22	16,17	11,03	5,14	37,8	13,60
23	18,37	15,08	3,29	19,7	16,73
24	21,85	18,04	3,81	19,1	19,95
25	23,70	19,59	4,11	19,0	21,65
26	8,58	7,74	0,84	10,3	8,16
27	35,77	28,99	6,78	20,9	32,38
28	36,98	30,73	6,25	18,5	33,86
29	14,54	12,12	2,42	18,2	13,33
30	29,51	22,58	6,93	26,6	26,05
31	6,57	5,72	0,85	13,8	6,15
32	11,48	9,49	1,99	19,0	10,49

33	7,60	7,89	-0,29	-3,7	7,75
34	13,36	14,48	-1,12	-8,0	13,92
35	10,36	8,83	1,53	15,9	9,60
36	26,82	26,08	0,74	2,8	26,45
37	17,14	13,94	3,20	20,6	15,54
38	7,11	6,36	0,75	11,1	6,735
39	12,44	8,70	3,74	35,4	10,57
40	9,77	8,38	1,39	15,3	9,075
41	21,97	17,65	4,32	21,8	19,81
42	9,96	8,53	1,43	15,5	9,245
43	17,16	13,49	3,67	23,9	15,33
44	7,61	6,18	1,43	20,7	6,90
45	12,73	11,02	1,71	14,4	11,88
Povprečje			2,72	17,4	
SD			1,98	8,6	

Povprečje razlik (µg/L)	Standardni odklon (µg/L)	95%IZ za aritm.sred. (µg/L)	95% IU (µg/L)
2,72	1,98	[2,14; 3,30]	[-1,16; 6,61]

Povprečje razlik (%)	Standardni odklon (%)	95%IZ za aritm.sred. (%)	95% IU (%)
17,4	8,6	[14,9; 19,9]	[1,0; 34,0]

Priloga 4. Vrednotenje ujemanja rezultatov **Fsh** z Krouwer-Monti analizo

N (štev. meritev)	COBAS (IU/L)	AXSYM (IU/L)	COBAS-AXSYM (IU/L)	PERCENTILI	PREPOGNJENI PERCENTILI
1	42,02	52,08	-10,06	0%	0%
2	89,28	94,27	-4,99	3%	3%
3	24,89	28,22	-3,33	6%	6%
4	21,03	21,62	-0,59	8%	8%
5	6,64	7,15	-0,51	11%	11%
6	5,07	5,34	-0,27	14%	14%
7	4,81	4,86	-0,05	17%	17%
8	5,64	5,67	-0,03	19%	19%
9	4,31	4,32	-0,01	22%	22%
10	6,48	6,46	0,02	25%	25%
11	1,78	1,66	0,12	28%	28%
12	5,61	5,49	0,12	28%	28%
13	5,54	5,41	0,13	33%	33%
14	9,79	9,65	0,14	36%	36%
15	7,46	7,32	0,14	39%	39%
16	5,24	5,05	0,19	42%	42%
17	6,16	5,97	0,19	42%	42%
18	6,20	5,87	0,33	47%	47%
19	3,27	2,90	0,37	50%	50%
20	7,86	7,43	0,43	53%	47%
21	6,88	6,42	0,46	56%	45%
22	5,82	5,34	0,48	58%	42%
23	9,90	9,37	0,53	61%	39%
24	6,56	5,96	0,60	64%	36%
25	7,72	6,99	0,73	67%	33%
26	13,26	12,53	0,73	69%	31%
27	8,06	7,21	0,85	72%	28%
28	17,59	16,49	1,10	75%	25%
29	8,48	7,17	1,31	78%	22%
30	37,51	36,06	1,45	81%	20%
31	20,02	18,37	1,65	83%	17%

32	29,90	28,22	1,68	86%	14%
33	17,19	15,39	1,80	89%	11%
34	11,30	9,31	1,99	92%	8%
35	54,98	52,91	2,07	94%	6%
36	64,43	61,98	2,45	97%	3%
37	19,31	16,04	3,27	100%	0%
Mediana			0,37		
5. percentil			-3,66		
95. percentil			2,15		

Priloga 5. Vrednotenje ujemanja rezultatov Lh z Krouwer-Monti analizo

N (štev. meritev)	COBAS (IU/L)	AXSYM (IU/L)	COBAS-AXSYM (IU/L)	PERCENTILI	PREPOGNJENI PERCENTILI
1	36,61	38,04	-1,43	0%	0%
2	20,84	22,25	-1,41	3%	3%
3	32,86	33,95	-1,09	5%	5%
4	13,73	14,81	-1,08	8%	8%
5	12,14	12,26	-0,12	10%	10%
6	10,80	10,89	-0,09	13%	13%
7	7,55	7,47	0,08	15%	15%
8	0,10	0,00	0,10	18%	18%
9	7,16	6,92	0,24	20%	20%
10	11,11	10,69	0,42	23%	23%
11	3,46	3,00	0,46	25%	25%
12	5,32	4,85	0,47	28%	28%
13	5,70	4,88	0,82	30%	30%
14	8,37	7,39	0,98	33%	33%
15	4,40	3,42	0,98	35%	35%
16	7,11	6,09	1,02	38%	38%
17	3,01	1,95	1,06	40%	40%
18	27,79	26,59	1,20	43%	43%
19	3,89	2,67	1,22	45%	45%
20	4,35	3,12	1,23	48%	48%
21	4,39	3,16	1,23	48%	48%

22	4,78	3,54	1,24	53%	48%
23	8,05	6,74	1,31	55%	45%
24	4,17	2,85	1,32	58%	43%
25	6,44	4,97	1,47	60%	40%
26	42,04	40,49	1,55	63%	38%
27	8,49	6,94	1,55	65%	35%
28	10,36	8,78	1,58	68%	33%
29	4,64	2,96	1,68	70%	30%
30	5,37	3,57	1,80	73%	28%
31	11,06	9,23	1,83	75%	25%
32	11,95	10,11	1,84	78%	23%
33	9,76	7,89	1,87	80%	20%
34	6,84	4,88	1,96	83%	18%
35	8,20	6,23	1,97	85%	15%
36	9,24	7,13	2,11	88%	13%
37	8,68	6,24	2,44	90%	10%
38	14,55	11,43	3,12	93%	8%
39	9,47	6,19	3,28	95%	5%
40	64,71	50,57	14,14	98%	3%
41	144,30	120,88	23,42	100%	0%
Mediana			1,23		
5. percentil			-1,09		
95. percentil			3,28		

Priloga 6. Vrednotenje ujemanja rezultatov **PrI** z Krouwer-Monti analizo

N (štev. meritev)	COBAS ($\mu\text{g/L}$)	AXSYM ($\mu\text{g/L}$)	COBAS-AXSYM ($\mu\text{g/L}$)	PERCENTILI	PREPOGNJENI PERCENTILI
1	13.36	14.48	-1.12	0%	0%
2	7.60	7.89	-0.29	2%	2%
3	5.62	4.90	0.72	5%	5%
4	7.29	6.55	0.74	7%	7%
5	26.82	26.08	0.74	9%	9%
6	7.11	6.36	0.75	11%	11%
7	8.58	7.74	0.84	14%	14%
8	6.57	5.72	0.85	16%	16%
9	11.63	10.72	0.91	18%	18%

10	10.70	9.61	1.09	20%	20%
11	13.31	12.20	1.11	23%	23%
12	9.77	8.38	1.39	25%	25%
13	7.61	6.18	1.43	27%	27%
14	9.96	8.53	1.43	30%	30%
15	10.36	8.83	1.53	32%	32%
16	12.73	11.02	1.71	34%	34%
17	9.12	7.35	1.77	36%	36%
18	16.59	14.73	1.86	39%	39%
19	12.65	10.77	1.88	41%	41%
20	12.86	10.89	1.97	43%	43%
21	11.48	9.49	1.99	45%	45%
22	15.61	13.52	2.09	48%	48%
23	14.70	12.37	2.33	50%	50%
24	14.54	12.12	2.42	52%	48%
25	14.64	12.15	2.49	55%	46%
26	17.99	15.31	2.68	57%	43%
27	19.83	17.08	2.75	59%	41%
28	17.14	13.94	3.20	61%	39%
29	15.11	11.89	3.22	64%	36%
30	18.37	15.08	3.29	66%	34%
31	17.59	14.06	3.53	68%	32%
32	17.16	13.49	3.67	70%	30%
33	15.79	12.11	3.68	73%	27%
34	12.44	8.70	3.74	75%	25%
35	21.85	18.04	3.81	77%	23%
36	26.46	22.55	3.91	80%	21%
37	23.70	19.59	4.11	82%	18%
38	21.97	17.65	4.32	84%	16%
39	21.48	16.43	5.05	86%	14%
40	16.17	11.03	5.14	89%	11%
41	24.49	18.34	6.15	91%	9%
42	36.98	30.73	6.25	93%	7%
43	35.77	28.99	6.78	95%	5%
44	29.51	22.58	6.93	98%	2%
45	27.88	20.16	7.72	100%	0%

Mediana			2.33		
5. percentil			0.724		
95. percentil			6.674		

